



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1609617 B

(45) 授权公告日 2012.02.15

(21) 申请号 200410080367.5

WO -03036299 A, 2003.05.01, 全文.

(22) 申请日 2004.09.29

易艳萍 等. 预防 SARS 病毒核酸疫苗的构建. 生物技术通讯 14 (3), 2003, 14(3), 200-201.

(30) 优先权数据

60/507, 207 2003.09.29 US

审查员 石剑平

(73) 专利权人 香港中文大学

地址 香港新界

(72) 发明人 梁子明 谭志恒 马振雄 林栢良

陈基湘

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 刘玉华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C07K 4/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN -1442488 A, 2003.09.17, 全文.

WO -03064450 A, 2003.08.07, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 42 页 附图 6 页

(54) 发明名称

诊断与预防严重急性呼吸道综合症(SARS)的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫学和分子生物学领域,描述了组合物和使用与 SARS CoV 核衣壳蛋白及刺突糖蛋白有关的蛋白、多肽及核酸的方法。具体地,本发明提供了用于鉴别和预防 SARS 感染的免疫激活剂制剂、预防性药物制剂、诊断分析方法及试剂盒。

1. 一种检测 SARS-CoV 的试剂盒,该试剂盒包括:
  - (a) 一种蛋白,其含有与 SEQ ID NO :2 和 / 或 SEQ ID NO :6 具有至少约 75%序列同源性的氨基酸序列 ;及
  - (b) 使用所述蛋白来检测生物样品中的抗 SARS 抗体的说明。
2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,还包括一固体支持物。
3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,还包括收集所述样品的一种或多种工具,该样品选自全血、血清、血浆、脑脊液、初乳、淋巴液、乳液、唾液、尿、鼻拭子、眼泪、粘液、腹水、精液、排泄物、痰、胎儿液。
4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中所述的氨基酸序列 SEQ IDNO :2 和 / 或 SEQ ID NO :6。
5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其中所述的蛋白是重组体。
6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,还包括一种特异识别与所述蛋白结合的抗 SARS 抗体的结合部分。
  7. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其中所述的结合部分是抗体。
  8. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其中所述的结合部分是被标记的。
  9. 如权利要求 8 所述的试剂盒,其中所述的结合部分被一种选自放射性同位素、荧光探针、发光团、磷和酶的标记物所标记。
  10. 如权利要求 9 所述试的剂盒,其中所述标记是酶,且所述的试剂盒还包括一种能被所述酶催化转变为可检测产物的分子。
11. 一种检测 SARS CoV 的诊断装置,该装置包括一种一蛋白结合其上的固体支持物,所述蛋白含有与 SEQ ID NO :2 和 / 或 SEQ IDNO :6 具有至少约 75%序列同源性的氨基酸序列。
  12. 如权利要求 11 所述的诊断装置,用于检测动物中的 SARS-CoV。
  13. 如权利要求 11 所述的诊断装置,其中所述的固体支持物是一种滴定板形式。
  14. 如权利要求 11 所述的诊断装置,其中的固体支持物被密封在一个盒子中。
15. 一种诊断试剂盒,其包括:
  - (a) 一种装置,其包括一种蛋白结合其上的固体支持物,该蛋白含有与 SEQ ID NO :2 和 / 或 SEQ ID NO :6 具有至少约 75%序列同源性的氨基酸序列 ;及
  - (b) 使用所述装置的说明。
16. 如权利要求 15 所述诊断试剂盒,还包括一种特异识别所述氨基酸序列的抗体。
17. 一种免疫刺激组合物,其包括:
  - (a) 一融合蛋白,该蛋白包括 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列,该氨基酸序列共价连接到一种免疫原肽上,该肽包括具有至少 10 个选自 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :18 的连续氨基酸的氨基酸序列 ;  
其中所述的融合蛋白还含有破伤风类毒素、白喉类毒素或 CpG- 寡核苷酸,及
  - (b) 一种药物学上可接受的赋形剂。
18. 如权利要求 17 所述的免疫刺激组合物,其中所述的破伤风类毒素、白喉类毒素或 CpG- 寡核苷酸化学连接到所述免疫原肽上。

## 诊断与预防严重急性呼吸道综合症 (SARS) 的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是 2003 年 9 月 29 日提交的专利申请 NO. 60/507, 207 的部分继续申请, 要求该在前申请的利益。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及免疫学、分子生物学领域, 描述了组合物和使用与 SARS CoV 核衣壳蛋白及刺突糖蛋白有关的蛋白、肽及核酸的方法。

### 背景技术

[0004] 严重急性呼吸道综合症 (SARS) 是由称为 SARS-CoV (Poutanen SM 等, 2003. N Engl J Med. Published at www.nejm.org March 31, 2003 ; Peiris JSM 等, 2003. Lancet 361, 1319-1325 ; Ksiazek TG 等, 2003. N Engl J Med. Published at www.nejm.org April 10, 2003 ; and Drosten C 等, 2003. N Engl J Med. Published at www.nejm.org April 10, 2003) 的新型冠状病毒引起的一种新的感染性疾病。根据其 29, 751bp 的基因组结构 (Marra MA 等, 2003. Science. Published at www.sciencexpress.org May 1, 2003 ; and Rota PA 等, 2003. Science. Published at www.sciencexpress.org May 1, 2003. ), 这种 RNA 病毒与其它已知的人类或动物冠状病毒有较大区别。然而, 与其它冠状病毒类似, 其具有多聚酶基因及称为 : 刺突 (S)、囊膜 (E)、膜 (M) 和核衣壳 (N) 的结构蛋白基因。此外, 它还具有另外 17 种蛋白的基因, 大部分为非结构的和一些假定的蛋白。

[0005] 通常, 冠状病毒通过其刺突糖蛋白来感染细胞, 此蛋白可与细胞上的特异细胞受体 (如氨基肽酶 N) 结合。初始黏附以后, 病毒的外壳与该细胞的浆膜融合, 并随后发生一系列的级联细胞内事件, 包括 M 与 N 蛋白间的相互作用 (Narayanan K 等, 2000. J Virol 74, 8127-8134), 最后导致后裔病毒体的产生。

[0006] 目前, 上述疾病通过临床表现和肺部放射片证据来诊断。SARS 的培养期一般在 2-7 天之间。通常, 患者会发展为高烧和呼吸问题, 如咳嗽和呼吸困难。因此, 急需简单的、快速的实验室方法来准确地检测这种病毒。

[0007] 目前有三种类型的 SARS-CoV 实验室检测方法 :

[0008] (a) 在细胞培养基中培养患者样品中的病毒并对其进行鉴别。

[0009] (b) 通过多聚酶链式反应 (PCR) 来检测患者样品中的病毒遗传物质。

[0010] (c) 对患者血液中病毒抗体进行检测。

[0011] 在 SARS 的早期 (如第一周), 用细胞培养和 PCR 方法检测患者样品中的病毒可能更可靠, 但随疾病的恶化, 其可靠性下降。相反, 在该疾病的后期 (如第一周以后), 该病毒的血清学检测更加可靠。因此, 培养或 PCR 和抗体方法彼此是互补的, 而且, 对所有 SARS 病例的检测可能需要这些方法的组合。

[0012] 目前临床医生可以使用两种血清学方法。间接免疫荧光分析法 (IF) 检测抗体

的结合,这些抗体可以来自感染的个体血清,甚至 SARS 病毒感染的猴细胞 (Vero),然后固定到显微镜玻片上。尽管最近商业制备的病毒感染细胞已有销售 (Euroimmun, Luebeck, Germany),但病毒感染的细胞通常由不同的实验室制备。结合的检测需要对显微镜玻片进行人工检查,因此实验室倾向于使用 IF 检测法,因为每个样品必须通过眼睛来分析,并主观地认定阳性或阴性结果,因此此种检测不用于大规模样品的高通量筛查。

[0013] 一种可选择的方法是酶联免疫吸附血清分析法 (ELISA)。这种 ELISA 分析使用固定到固体表面上的抗原性病毒抗原。患者血清与这种抗原一起孵育,随后检测血清中抗体与该抗原的结合,例如,使用比色分析法检测。尽管 ELISA 方法属于高通量方法,但目前还没有商业销售的 ELISA 试剂盒供应。而且,由于产率低,所以用活病毒制备该方法所使用的抗原有困难,在制备中批与批之间的差异不可避免,且病毒的培养对健康具有威胁。

[0014] 因此,开发预防和减轻感染的预防性疫苗在与 SARS CoV 感染的斗争中非常重要。鉴别出能引起对病毒颗粒和 / 或病毒感染细胞免疫反应的抗原蛋白,是开发任何这样疫苗的重要步骤。至今,还没有开发出以蛋白为基础的抗 SARS CoV 疫苗。

## 发明内容

[0015] 为了克服 SARS CoV 诊断和预防的不足,本发明提供了基于肽和蛋白的具体实施方案,该肽和蛋白附加命名为核衣壳抗原和核酸编码的核衣壳抗原。为帮助 SARS 的诊断,本发明利用提供了用患者样品来检测 SARS CoV 感染的方法具体实施方案,所述方法包括:

[0016] (a) 将生物样品与一种蛋白接触,该蛋白含有一氨基酸序列,该氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 或两者至少具有约 75%,更优选至少约 80%、85%、90%,最优选至少约 95%、98%、99%、100% 的序列同源性,优选该氨基酸序列为 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 或两者,更优选该氨基酸序列也是重组体 ;及

[0017] (b) 检测生物样品中的与该接触蛋白结合的抗体,其中所述抗体与该蛋白的结合表明患者感染了 SARS CoV。

[0018] 此具体实施方案的一个方面包括应用只含有 SEQ ID NO :2 氨基酸序列的蛋白或含有 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :6 相互以不同比例组合的蛋白。此具体实施方案的另一方面包括可选择地将所述蛋白固定在固体支持物上,该支持物优选由塑料和玻璃制成。可选择地,所述固体支持物选自微球体、微平板和膜。

[0019] 本发明中的生物样品选自全血、血清、血浆、脑脊液、初乳、淋巴液、乳液、唾液、尿、鼻拭子、眼泪、粘液性腹水、精液、排泄物、痰、胎儿液及其类似物。

[0020] 在一些具体实施方案中,接触生物样品的蛋白是一种可在细菌中产生的融合蛋白。

[0021] 在本发明的另外一些具体实施方案中,接触生物样品的蛋白是 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 或二者的氨基酸序列的一个片段。

[0022] 在上述诊断方法的一些具体实施方案中,检测抗体与所述接触蛋白的结合包括用标记分子接触已结合到该蛋白上的所述抗体,该标记分子特异性识别已结合到该蛋白上的所述抗体 ;随后检测标记分子。所使用的标记可以是本领域所述技术人员已知的任何适合的标记,例如,放射活性同位素、荧光探针、发光团、磷和酶。在本发明优选实施例中,该标记是酶,而且鉴定步骤还包括用一分子接触该标记,该分子经酶催化转变为一个可检测 (例

如显色)产物。

[0023] 在所述蛋白是一种分子混合物中的一成分的情况下,本发明的上述方法包括附加的步骤。此附加的步骤包括从该分子混合物的其它成分中分离所述的蛋白;及随后转移蛋白到一固体支持物上。优选的固体支持物包括聚二氟乙烯、尼龙、纤维素及其衍生物。在此可选方法的一些实施例中,蛋白的分离包括通过诸如琼脂糖、纤维素、多孔硅和聚丙烯酰胺等多孔渗水支持物来对该分子混合物电泳。

[0024] 本发明的另外一些具体实施方案提供了预防性药物,如基于蛋白或肽的疫苗。因此,本发明提供了一种含有蛋白和一种药物学上可接受的赋形剂的疫苗,该蛋白选自与 SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:6或两者或其片断具有至少约75%,更优选至少约80%、85%、90%,最优选至少约95%、98%、99%、100%序列同源性的氨基酸序列。在一些实施例中,该疫苗还含有佐剂。在该具体实施方案的其它实施例中,所述蛋白为可在真核系统中产生的融合蛋白。本发明的其它方面还提供了抗体或抗病毒药物等疫苗制剂。

[0025] 在本发明的另一具体实施方案中,所述疫苗含有一种蛋白,该蛋白与含一氨基酸序列的蛋白融合,所述氨基酸序列中至少约75%序列与选自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:18的氨基酸序列同源。可选择地,该疫苗包括一种含有免疫原肽的融合蛋白,该免疫原肽选自由SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:18的至少约10个相邻氨基酸组成的氨基酸序列,其中,当导入到哺乳动物系统中时,该免疫原肽会产生免疫反应。

[0026] 除预防性蛋白质疫苗外,本发明还提供了含有一种细胞的活疫苗的具体实施方案,该细胞包括一种核酸序列,该核酸序列含有与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:6或两者或其片段具有至少约75%,更优选80%、85%、90%,最优选95%、98%、99%、100%序列同源性的第一蛋白的编码序列,其中该编码序列可操作地连接在适于细胞内表达所述第一蛋白的表达系统中。该活疫苗的一些实施例含有一种核酸,该核酸还包含位于所述第一蛋白的编码序列框架中的第二蛋白的编码序列。可选择地,该活疫苗还可含有一种佐剂。在该具体实施方案的优选实施例中,该蛋白是分泌蛋白,此时其可进入到细胞外空间或与细胞表面结合,优选通过与细胞表面的锚的相互作用而与细胞表面结合。

[0027] 为帮助使用者实施本发明,本发明提供检测SARS-CoV的试剂盒。在本发明优选的具体实施方案中,该试剂盒,例如包括一种蛋白和使用所述蛋白检测生物样品中抗SARS抗体的说明,该蛋白可以是重组蛋白,含有与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:6或两者具有至少约75%,更优选至少约80%、85%、90%,最优选至少约95%、98%、99%或100%序列同源性的氨基酸序列的蛋白,优选该氨基酸序列是SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:6或两者。该试剂盒具体实施方案的一些实施例还包括一固体支持物。其它的实施例可选择地包括一种或更多收集样品的工具,这些样品可来源于含有抗核衣壳抗原抗体的机体组织、液体或废物。这些样品包括但不限于:全血、血清、血浆、脑脊液、初乳、淋巴液、乳液、唾液、尿、鼻拭子、眼泪、粘液、腹水、精液、排泄物、痰、胎儿液等。

[0028] 上述具体实施方案的其它方面的试剂盒还包含特异性识别与所述蛋白结合的抗SARS抗体的结合部分。优选地,该结合部分是抗体、更优选是经标记的抗体。适于该结合部分的标记包括:放射活性同位素、荧光探针、发光团、磷和酶。特别优选的是酶,当本发明试剂盒的具体实施方案使用酶标记时,该试剂盒优选包含一个由该酶催化转变为可检测产物的分子。

[0029] 本发明诊断 SARS 的其它具体实施方案包括用于检测 SARS CoV 感染的诊断装置, 该装置含有一固体支持物, 一蛋白结合其上, 该蛋白含有与 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 或两者具有至少约 75% 的序列同源性的氨基酸序列, 优选该氨基酸序列是 SEQ ID NO :2 或 SEQ IDNO :6 或两者。在一些具体实施方案中, 所用的蛋白是重组体。该诊断装置适于检测人或动物的 SARS-CoV。优选地, 该诊断装置含有一作为测量板而使用方便的固体支持物。更优选地, 该固体支持物密封在一盒子中, 以防止上述组分受到破坏或污染等。

[0030] 本发明的诊断装置具体实施方案可以是试剂盒具体实施方案的一部分。例如, 本发明的一些具体实施方案的试剂盒包含一装置和使用该装置的说明, 该装置含有一固体支持物, 一蛋白结合其上, 该蛋白含有与 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 或两者或其片段具有至少约 75%, 更优选至少约 80%、85%、90%, 最优选至少约 95%、98%、99% 或 100% 的序列同源性的氨基酸序列。这些试剂盒可包括多种的可选组分, 其如上所述。本试剂盒具体实施方案的一个优选选择是能够特异识别上述氨基酸序列的抗体。

[0031] 本发明的其它具体实施方案包括能同时用作诊断和治疗试剂的融合蛋白。因此, 本发明提供了一种利用患者样品来检测 SARS-CoV 的方法。该方法包括将生物样品与一种融合蛋白接触, 该融合蛋白含有与两种 SARS CoV 蛋白、核衣壳蛋白和刺突糖蛋白同源的氨基酸序列。此核衣壳蛋白衍生部分含有与 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 具有至少约 75%, 更优选至少约 80%、85%、90%, 最优选至少约 95%、98%、99%、100% 序列同源性的氨基酸序列。此核衣壳蛋白衍生部分共价连接到刺突糖蛋白氨基酸序列的衍生肽上。该衍生肽含有一个氨基酸序列, 该氨基酸序列含至少 10 个, 更优选至少 12、14 或 16 个, 最优选至少 20 个氨基酸序列 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :18 的连续氨基酸。通过检测生物样品中与所述接触融合蛋白结合的抗体, 从而确定 SARS CoV 的感染。

[0032] 本发明还包括另外一个具体实施方案, 即免疫刺激物的组合物。该组合物包括上述融合蛋白和药理学上可接受的赋形剂。在该具体实施方案的另一实施例中, 该融合蛋白包括可与免疫原肽化学连接的破伤风类毒素、白喉类毒素或 CpG- 寡核苷酸, 该免疫原肽含有由至少 10 个 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :18 的连续氨基酸组成的氨基酸序列。

[0033] 附图的简要说明

[0034] 图 1 所示为病毒抗原与 SARS 患者血清反应的电泳胶。图 1A 所示为考马斯亮兰 (Coomassie) 标记的病毒抗原胶, 一块胶的一部分 CB 用于 Western 印迹分析。图 1B 所示为抗天然病毒提取物的一些患者血清的 Western 印迹分析;

[0035] 图 2 所示为各种检测方法用于检测 SARS 和非 SARS 患者血清中的 SARS CoV 的检测效率比较;

[0036] 图 3A 为显示其重要抗原的 SARS-CoV 病毒的结构示意图;

[0037] 图 3B 为本研究中显示每个抗原或抗原亚基大小 (氨基酸数目) 的重组抗原图谱;

[0038] 图 3C 为显示亲和纯化重组抗原的纯度和广度的胺电泳胶图;

[0039] 图 4A 显示了 rNa ELISA (重组 N- 末端核衣壳蛋白) 与 IF 检测的差异性, 及 rNa ELISA 与天然抗原 ELISA 检测的相似性;

[0040] 图 4B 显示了 rNb ELISA (重组 C- 末端核衣壳蛋白) 与 IF 检测的差异性, 及 rNb ELISA 与天然抗原 ELISA 或 rNa ELISA 检测的差异性。

[0041] 图 4C 显示了同时使用重组抗原 (rNa+rNb) 的 ELISA 与 IF 检测的相似性。

[0042] 图 5A 所示为两个患者 (S35 和 S44) 血清的 Western 印迹分析,用含有用作抑制剂的各种抗原的天然 SARS CoV 病毒提取物进行。

[0043] 图 5B 为抗天然病毒提取物的小鼠血清的 Western 印迹分析。血清 1、2 和 3 分别来自 rNa 免疫 (初始剂量 +1 次强化) 的 3 只 BALB/c 小鼠。U 血清来自非免疫小鼠 (3 只小鼠为代表);S 血清来自用 rSa 或 rSb (每组 3 只小鼠为代表) 抗原免疫 (与 rNa 方法相同,并相同剂量的抗原) 的小鼠。

[0044] 图 5C 为免疫小鼠血清滴定图 5B 中使用的分别免疫的抗原 (rNa-GST、rSc-GST 或 rSa-GST) 获得的 ELISA 结果图

[0045] 图 6 为抗体与核衣壳蛋白反应的结果图,如 rNa ELISA 检测一样,核衣壳蛋白来源于死亡的和存活的 SARS 患者。同时也显示了 IF 的检测结果。

[0046] 图 7 为商业销售的 ELISA 检测试剂盒与本发明中具体实施方案的敏感性比较柱状图。

[0047] 定义

[0048] 除非有其它定义,本文使用的所有技术和科学术语为本发明领域所属技术人员通常理解的含义。以下的参考文献可为所属技术人员提供一些本发明所用术语的一般性定义:Singleton 等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger 等 (eds.), Springer Verlag (1991); 及 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。如上所述,以下术语的含义取决于它们,除非特指另外的含义。

[0049] “约”指一个加减 10% 特定值的数值范围。例如短语“约 80%”包括 80% 的加减 10%, 或从 72% 到 88%。

[0050] “氨基酸”指天然产生和合成的氨基酸,和与天然氨基酸有相似功能的氨基酸类似物和模仿物。天然氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,这些氨基酸随后可被加工,例如,羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸、和谷氨酸酯 (盐) 及  $\alpha$ -磷酸丝氨酸。

[0051] “氨基酸类似物”指具有与天然产生氨基酸相同基本化学结构的氨基酸,即有一个与氢结合的碳、一个羧基基团和一个 R 基团,例如同型丝氨酸、正亮氨酸、硫氧蛋氨酸或蛋氨酸甲基硫。这样的类似物具有改变的 R 基团 (如正亮氨酸) 或改变的肽骨架,但保留与天然产生氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与一般氨基酸化学结构不同的化合物,但其功能与天然产生的氨基酸相似。

[0052] “氨基酸序列”指存在于所给肽或蛋白中氨基酸残基的位置关系。

[0053] “动物”包括但不限于饲养动物如奶牛、绵羊、猪、马、山羊和家禽 (例如鸡、火鸡、鸭、禽、观赏鸟和鹅)、诸如狗猫的宠物;外来和 / 或动物园动物;及实验室动物如小鼠、大鼠、家兔、豚鼠和仓鼠。

[0054] “抗体”或“功能抗体”指基本上由免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽配体,其特异性结合和识别抗原决定基 (如抗原)。抗体由两型多肽的相互作用来结构性定义,一个命名为“抗体轻链”,另一个命名为“抗体重链”。每个抗体的轻链通过一个或多个的称为二硫桥的共价键共价连接到抗体的重链。每个二硫桥由两个半胱氨酸残基的  $\gamma$ -硫基间的二硫

键构成,一个半胱氨酸属于抗体重链部分,另一个半胱氨酸属于抗体轻链部分。除与抗体轻链的共价作用外,每个抗体重链还与一个或多个抗体重链发生共价连接。与抗体重链和轻链的连接相同,两个抗体重链间的相互连接也是一个或多个二硫桥实现的。该重链决定抗体的类别: IgM、IgG、IgA、IgD 或 IgE。IgM 抗体是最早在免疫反应血清中出现的抗体,而其它抗体,特别是 IgG 出现较晚。在感染中, IgG 抗体通常比 IgM 抗体的产生量多。

[0055] 通常,每个抗体的轻链和每个抗体的重链由单独的转录单位或基因编码。然而,本发明提供了同时编码重链和轻链的嵌合体抗体基因,其包括但不限于嵌合基因,其中重链和轻链、两个重链或抗体重链或轻链任意组合的重复的编码序列通过一个位于各自编码抗体序列框架内的编码连接肽的核酸来连接。

[0056] 识别的免疫球蛋白基因包括  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链不变区基因、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\mu$  重链不变区基因,及无数的免疫球蛋白可变区基因。抗体,例如以完整的免疫球蛋白或以经各种肽酶消化的一些已知特性的片段的形式存在。这包括例如以下要讨论的 Fab' 和 F(ab)'<sub>2</sub> 片段。

[0057] 本文所用术语“抗体”还包括整个抗体改造的或通过重组 DNA 方法从头合成的抗体片段。其还包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合体抗体、人源化抗体或单链抗体。抗体的“Fc”部分指一个免疫球蛋白重链的一部分,其包括一个或多个重链不变区功能域: CH1、CH2 和 CH3,但不包括重链可变区。

[0058] 抗体能以完整的免疫球蛋白或以经各种肽酶消化的一些已知特性的片段的形式存在。因此,例如胃蛋白酶在铰链区二硫键连接以下消化抗体可产生一个 Fab 的二聚体 F(ab)'<sub>2</sub>,其本身是一个通过二硫键连接到切去顶端的重链上的轻链。在温和的条件下,可打断铰链区的二硫连接而还原 F(ab)'<sub>2</sub>,即将 F(ab)'<sub>2</sub> 二聚体转变为 Fab' 单体。Fab' 单体本质上是带有铰链区的 Fab (参见 Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993))。当各种抗体片段为完整抗体的消化形式时,这样的片段可通过化学或重组 DNA 的方法从头合成。因此,本文中的术语抗体还包括通过整个抗体的改造产生的、或通过重组 DNA 的方法(例如单链 Fv) 从头合成的、或通过噬菌体展示库(参见例如 McCafferty 等, Nature 348: 552-5545 (1990)) 鉴定的抗体片段。

[0059] 通常,一个功能性抗体能够特异地或选择性地识别一个抗原上的一个或多个抗原决定部位。例如,一个“特异识别稳态报告元件 (scorable homeostatic reporter element) 产物的抗体”是指,在特定的免疫分析条件下,能够至少 2 倍于本底地与本发明中稳态报告元件编码蛋白结合的一个抗体,并且基本上不与该样品中其它蛋白发生显著的结合。通常,一个功能性抗体在一个特异的或选择性的反应中可与其抗原结合,产生一个至少 2 倍于本底信号或噪声的信号,而更常见的是 10-100 倍于本底,以此在异种抗原群和其它生物制剂、抗 SARS 抗体中来确定其抗原的存在。

[0060] 本文所述的一个“抗-核衣壳抗体”是特异识别核衣壳抗原的任意抗体。同时,“抗 SARS CoV 抗体”指特异识别 SARS CoV 病毒相关抗原的任意抗体。

[0061] “抗原的”或“抗原”指在适当的条件下能够诱导特异性免疫反应和与某些物质反应的产物反应的物质,例如与特异的抗体或特异致敏的 T 淋巴细胞或两者反应的产物。抗原可以是诸如核酸、肽或蛋白的可溶性物质,或诸如细菌和组织细胞的颗粒;然而,只有蛋白或多糖分子中已知是抗原决定基 (epitopes) 的部分与抗体或特异的淋巴细胞上特异的

受体结合。

[0062] “抗原中性载体蛋白”指共价或非共价地与另一分子结合,在给予宿主有机体中时不刺激免疫反应的蛋白。

[0063] “病毒药物”是任意药物可接受的组合物,该组合物能够抑制至少 30%、更优选 40%、50%、60%、70%、80%,或至少 90%、95%或 98%病毒感染。

[0064] “生物样品”或“患者样品”指取自活或死的有机体的任何样品。生物样品的例子包括但不限于生物液标本和活检样品。生物液体标本包括但不限于全血、血清、血浆、脑脊液、初乳、淋巴液、乳液、唾液、尿、鼻拭子、眼泪、粘液性腹水、精液、排泄物、痰、胎儿液等。

[0065] “细胞表面锚”是任何具有束缚自身或任何相关分子实体到细胞表面的分子。细胞表面锚可与任何与细胞表面有关的结构相互作用来完成其功能,包括共价和非共价连接。

[0066] 与核酸序列有关的术语“编码序列”指多个三核苷的连续系列,命名为密码子,每个密码子对应一个根据通用的遗传密码的生化因子翻译的氨基酸,其全长序列编码一个表达蛋白,或反义链抑制蛋白的表达。一个“遗传编码序列”的相邻密码子被非编码的插入序列或称“内含子”间断性中断。在 mRNA 合成中,内含子被去除,恢复相邻的密码子序列来编码蛋白或反义链。

[0067] 本文中术语“互补的”或“互补”指由碱基配对原则关联的多核苷酸(即一个核苷酸序列)。例如,序列“5' -AGT-3' ”与序列“5' -ACT-3' ”互补。互补可以是“部分的”,其中根据碱基配对原则,只要某些核酸碱基对应。或者,核酸间可以是“完全”或“全部”互补。核酸链间的互补程度对核酸链间的杂交效率和强度具有显著的作用。这对依赖核酸间的结合的方法是非常重要的。

[0068] 术语“表达系统”最小地是指所有调控核酸序列,该序列必须可操作地连接到表达蛋白的编码序列中。该术语还指能够针对编码序列来调节蛋白表达的选择性调控核酸序列。

[0069] 在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“一致的”或比例一致性,“一致性”是指,用下述一种序列比较算法或人工排列和视觉检查的方法对一个比较窗口或指定区域进行最大相关性比较和排列,相同的或具有特定比例的氨基酸残基或相同核苷的两个或多个序列或亚序列(即,与如 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列或如 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :3 的核酸序列具有 60%一致性,65%、70%、75%、80%,优选 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性)。这些序列于是被称为“基本一致”。此定义还指对一个检测序列的评价。优选的,一致性是针对至少约为 25 个氨基酸或核苷酸长度的区域而言的,更优选的是针对 50-100 个氨基酸或核苷酸长度的区域而言。

[0070] 为了进行序列比较,通常将一个序列作为参考序列,所检测的序列与其比较。使用序列比较算法时,将检测和参考序列输入计算机,随后指定坐标,如果需要,可指定序列算法的程序参数。可使用默认的程序参数,或指定选择参数。为比较 HIV 囊膜糖蛋白和含囊膜糖蛋白的融合蛋白及编码其核酸序列的序列,可使用以下讨论的 BLAST 和 BLAST 2.0 算法和默认的参数。

[0071] 本文所用的一个“比较窗口”包括相邻位置数目选自 20-600、通常约 50 到约 200、更通常约 100 到约 150 的任意一个片段,其中,在两个序列理想对齐后,一个序列可以与一个相邻位置的相同数目的参考序列进行比较。比较序列排列的方法是本领域公

知的。理想的比较序列排列的方法可以是,例如, Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2 : 482(1981) 中描述的区域同源性算法、Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48 :443(1970) 中描述的同源性排列算法、Pearson&Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85 :2444(1988) 中描述的相似性寻找方法、计算机处理的算法的实施 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the WisconsinGenetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)、或人工排列和视觉分析 (参见如 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 等, eds. 1995 supplement))。

[0072] 适于确定百分比序列一致性和序列相似性的算法的优选实施例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,这些算法分别在 Altschul 等人的 Nuc. Acids Res. 25 :3389-3402(1977) 和 Altschul 等人的 J. Mol. Biol. 215 :403-410(1990) 的文章中作了详细描述。通过本文所述的参数,使用 BLAST 和 BLAST 2.0 来确定本发明中核酸和蛋白的百分序列一致性。进行 BLAST 分析的软件由国立生物技术信息中心免费提供 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。该算法包括首先通过识别查询序列中的长度为 W 的短字来识别高分值序列对 (HSPs), 当其 与数据库序列的相同长度的字对齐时,其匹配或满足某些取正值的阈值 T。T 指相邻字记分 阈值 (Altschul 等, 见上文)。这些初始相邻的字的选中作为种子启动搜索以发现更长的包 含这些字的 HSPs。只要累积的对齐分值能够增加,就将字的选中沿着每个序列的两个方向 延伸。对于核酸序列,使用参数 M (一对匹配残值的得分,总是 > 0) 和 N (不匹配残值的罚 分,总是 < 0) 来计算累计分值。对氨基酸序列,使用一种记分矩阵计算累计分值。在下列情 况下,每个方向上的字选中的延伸将被停止:累积的对齐分值少于其达到的最大值达 X 的 数量时;由于一个或更多的负记分残值对齐的累计导致累计分值达到零或低于零;或到达 任一序列的末端。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定对准的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对核 酸序列) 使用的字长度默认值 (W) 为 11、期望值 (E) 为 10、M = 5、N = -4 及两条链的比较。 对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用的字长度 (W) 默认值为 3,期望值 (E) 为 10 及 BLOSUM62 记分矩阵 (参见 Henikoff&Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915(1989)) 对齐值 (B) 为 50、期望值 (E) 为 10, M = 5、N = -4 及两条链的比较。

[0073] BLAST 算法还可提供两个序列相似性的统计学分析 (参见如 Karlin&Altschul, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90 :5873-5877(1993))。其中 BLAST 算法提供一个相似性 分析时最小总和概率 (P(N)), 其提供概率的指示,预示两个核酸或氨基酸序列匹配发生的 机会。例如,如果检测核酸与参考核酸比较中的最小总和概率小于约 0.2、更优选小于约 0.01、及最优选小于约 0.001,认为此核酸与参考序列相似。

[0074] 如下所述,两个核酸序列或多肽基本一致表明第一个核酸编码的多肽与第二个核 酸编码的多肽所产生的抗体有免疫交叉反应。因此,如果一个多肽与另一多肽仅是保守替 代不同,那么这两个多肽通常是基本一致的。如下所述,两个核酸序列基本一致还表明在严 格条件下这两个分子或它们的互补序列可相互杂交。两个核酸序列基本一致还表明可以使 用相同的引物来扩增该序列。

[0075] 所述一种分子“固化”在例如表面上,即当不改变诸如温度、压力、pH、离子强度、或 无论自发或催化下进行化学转型的分子,该分子不能离开表面。通常的分子一般固化在“固 体的支持物”上。

[0076] “分子混合物”指任意固态、气态或液态的两种或多种不同分子的组合物。

[0077] “核酸”指任何单链或双链形式的脱氧核糖核酸或核糖核酸和其聚合物。该术语涵盖包含已知的核酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸,其是合成、天然产生和非天然产生的,其与参考核酸具有相似的结合特性,并且其与参考核酸具有相似的代谢特性。这些类似物的例子包括但不限于:硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核酸和肽-核酸(PNAs)。

[0078] 除非有不同的解释,一个特定的核酸序列还隐含其保守修饰的变体(如简并密码替代物,如下所示)和互补序列,及明示序列。

[0079] “核衣壳抗原”指含有与 SEQ ID NO:2 具有至少约 75%,更优选至少约 80%、85%、90%,最优选至少约 95%、98%、99%、100% 序列同源性的氨基酸序列的肽或蛋白,其可引起至少 30%,更优选至少 40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多的用本领域所述的定量 ELISA 检测或定量 CTL 分析能检测到的免疫反应。

[0080] 本文短语“可操作性连接”是指相对于核酸,启动子、终止子和/或控制元件的连接方向,该核酸可操作地与启动子、终止子和/或控制元件连接,从而使该核酸能够进行转录。这种结构的启动子、终止子和/或控制元件组成了一个“表达系统”。表达系统还可指启动子、终止子和/或控制元件可操作与编码肽或蛋白的核酸连接。

[0081] 本文使用的术语“肽”和“蛋白”指氨基酸残基的聚合物。这些术语还可用于一些氨基酸聚合物,其中的一个或多个氨基酸残基是与天然产生的氨基酸、天然产生的氨基酸聚合物和非天然产生的氨基酸聚合物对应的人工合成的化学模仿物。如本文所述,本发明中的肽和蛋白包括含独立氨基酸残基的 D- 和 L- 异构体的氨基酸聚合物,还包括其它氨基酸变体。肽由组成其分子的一级结构中氨基酸残基数量来命名。根据本发明的目的,肽是含多至 50 个氨基酸残基的分子,而蛋白含 50 个或更多的氨基酸残基。但是,本发明中肽和蛋白的合成和/或运输是相同的,如果不同,可被本领域所属技术人员所预见。因此,如果合适,这些术语在讨论合成、修饰、或用于治疗或诊断试剂的情况下是同义词。

[0082] “药物可接受赋形剂”指用作药物稀释剂或载体的惰性物质。

[0083] “多孔支持物”包括但不限于琼脂糖、纤维素、多孔硅胶和聚丙烯酰胺。

[0084] 在氨基酸序列的上下文中,“序列同源性”指属于相同类型或系列的物质的对应性或相似性;有小的、规律性变化的,并通常会发生规律性物理变化的合成物的相似性;如甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸等之间存在同源性。即该术语是指在同源氨基酸的改变方面不同的两个序列,该改变是各自序列中对应氨基酸侧链基团发生化学变化。

[0085] 本文所用的术语“固体支持物”,广义地指那些本领域所属技术人员公知并能够得到的一系列支持物。固体支持物包括但不限于硅胶、树脂、衍生塑料膜、玻璃小珠、棉花、塑料小珠、氧化铝凝胶及其类似物。本文所用的“固体支持物”还包括合成的含抗原的基质、细胞、脂质体及其类似物。根据使用的最终目的和各种实验步骤的要求来选自适当的固体支持物。本发明实施方案中适合的固体支持物包括,例如 ELISA 分析用的塑料或玻璃表面、或惰性小珠;western 印迹使用的固体支持物的例子包括二氟聚乙烯、尼龙、纤维素及其衍生物。固体支持物包括微球体、微平板或膜。在一些具体实施方案中,所述固体支持物可有反应性的表面或包被来帮助分子部分粘附。本发明中的固体支持物还可能有密封或多孔渗水的表面。在一些实施方案中,因其能提供更大的表面来结合本发明所述的分子,因此优选多孔渗水表面。适于本发明使用的多孔表面的实例包括琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶、纤维素和

多孔硅。

[0086] 所述短语“严格的杂交条件”（“严格条件”）指在复杂的核酸混合物中，以此条件下探针通常可与其靶亚序列杂交，而不与其它序列杂交。严格条件是序列依赖性的，不同的情况有不同的条件。较长的序列杂交需要更高的特异温度。广义的核酸杂交指南可参见 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)。通常，严格条件选择在特定离子强度，pH 时和低于该特定序列变性温度 ( $T_m$ )  $5^{\circ}\text{C}$ – $10^{\circ}\text{C}$  的温度。 $T_m$  是指在反应平衡时 50% 的与靶互补的探针与该靶序列杂交的（在靶序列过量的条件下，在  $T_m$ ，平衡状态下 50% 的探针被占据）的温度（在特定的离子强度、pH 和核酸含量）。严格条件还包括，在 pH 7.0–8.3、及对短探针至少为  $30^{\circ}\text{C}$ （如 10–50 核酸）、对长探针（如大于 50 个核酸）至少为  $60^{\circ}\text{C}$  的温度下，盐的浓度小于约 1.0M 钠离子，通常约为 0.01–1.0M 钠离子浓度（或其它盐）。严格的条件还可通过加入诸如甲酰胺的去稳定剂来实现。对于高度严格的杂交，阳性信号为 2 倍于本底、优选 10 倍于本底的杂交。可实施的高度严格条件或严格的杂交条件包括：用 50% 甲酰胺、 $5\times\text{SSC}$  和 1% SDS，在  $42^{\circ}\text{C}$  孵育，或用  $5\times\text{SSC}$  和 1% SDS 在  $65^{\circ}\text{C}$  孵育，用  $0.2\times\text{SSC}$  和 0.1% SDS 在  $65^{\circ}\text{C}$  洗涤。

[0087] 如果编码的多肽基本是一致的，那么在严格条件下核酸不能相互杂交也认为基本一致。例如，当使用了遗传密码允许的最大化的密码简并，就会产生一个核酸的拷贝。在这种情况下，核酸通常可在缓和的严格条件下杂交。“缓和的严格条件”包括  $37^{\circ}\text{C}$  条件下，在 40% 甲酰胺、1M NaCl、1% SDS 的缓冲液中杂交，用  $1\times\text{SSC}$  在  $45^{\circ}\text{C}$  洗涤。阳性增加至少是 2 倍于本底。本领域所属技术人员应认识到，改变杂交和洗涤条件也可提供相似的严格条件。

[0088] 引用参考

[0089] 本说明书所引用的所有公开和专利申请此处都引为参考，就如各个公开或专利申请被单独说明和引用一样。

[0090] 实施方案

[0091] I. 介绍

[0092] 本发明提供一个取自病毒核衣壳蛋白的 SARS CoV 特异性抗原，该抗原可与从 SARS CoV 病毒感染的个体中制备的抗体排他性的反应。如图 1 所示，其鉴定了与 SARS 患者的血清反应的病毒抗原。图 1(A) 所示为通过电泳和染料（考马斯亮，CB）标记获得的来自病毒感染培养细胞的病毒粗混合物的分离。U 为对照未感染细胞。1 和 2 为感染细胞的不同样品；表明了这些不同样品在 36–48kD 范围内有微小的蛋白亮度（条带）差异。WB 为制样品 #2 与 SARS 血清反应的结果，显示出了高反应性抗原 N1、N2 和 N3。图 1(B) 提供了一 6 个 SARS 和 4 个非-SARS 肺炎患者的附加 Western 印迹分析结果，显示了 N1–N3 抗原的强反应，及刺突 (S) 蛋白和 80kD、60kD 蛋白的较弱反应。

[0093] 本发明的诊断性用途如图 2 所示，其中比较了各种 SARS 实验的检测效率。通过 IF、WB 或 ELISA 实验对每组患者（46 个 SARS 患者、40 非-SARS 肺炎患者和 38 个健康个体）血清的检测结果如图所示。所用抗原如图 3 所示；即：S 为刺突；N 为核衣壳；crude 为天然病毒提取物；rNa 或 rNb 为重组核衣壳（亚基 a 或亚基 b）；p N2, 3, 为凝胶分离的天然抗原纯化的 N2 和 N3 抗原。除了实验中标记的“IgM”，试验只检测 IgM，其它所有实验都是对

IgG 抗体进行检测。每个实验中,高于阴影柱的为阳性结果。对于 ELISA 分析,阳性结果的去除了根据非-SARS 肺炎患者和健康个体同类组合的平均值加 1 个 SD。在 Western 印迹分析中,用眼来给反应强度打分(3 为最强)。没有进行实验的血清以点来表示;它们没有检测的原因是缺少抗原或血清,或结果没有可读性。

[0094] 图 3A 为显示其重要抗原的 SARS-CoV 病毒的结构示意图。图 3B 为本文所讨论的细菌重组抗原图,其显示了每个抗原或其亚基的大小(氨基酸数目)。图 3C 为亲和纯化重组抗原的纯度和广度的凝胶电泳图。

[0095] 当通过本发明中的 ELISA 方法进行比较时,图 4A 显示了重组 N-末端核衣壳蛋白 rNa(SEQ ID NO:2)与来源于细胞裂解液天然核衣壳抗原的相似性,而 IF 与 ELISA 方法检测的重组 N-末端核衣壳蛋白却显示较少的相似性。图 4B 显示了 C-末端重组核衣壳蛋白 rNb(SEQ ID NO:6)的相反结果。这表明,患者的两个核衣壳成分(rNa 和 rNb)(图 4B 最后一图)不能产生相同的抗体,还表明两种核衣壳成分相互间互补(图 4C 第一个图和图 2)。实际上,两种成分可以以不同的比例组合,因此可发现理想的比值来提供其分析敏感性和特异性的最佳结果。由于 rNb 成分比 rNa 成分特异性小,因此组合中含有较少的 rNb 成分理想的(资料未显示)。

[0096] 图 5A 提供了病毒主要反应性抗原的证据,在 Western 印迹分析中其标记为 N1、N2 和 N3,是所有核衣壳抗原。另一个核衣壳成分标记为 N4,其反应性较小,同时还在抑制实验中出现。图 5B 用 Western 印迹分析法证实了 N1、N2、N3 和 N4 是核衣壳抗原,使用的是预先用 N-末端重组核衣壳蛋白免疫的小鼠血清。这些结果表面 N2、N3 和 N4 均是通过细胞加工片断化而来源于 N1,而且 N1 的 C-末端增加的长度在 N2 到 N4 中被删除。这就是为什么天然病毒提取物与 N-末端重组核衣壳抗原比 C-末端重组核衣壳抗原更相似的原因。

[0097] 图 5C 显示了 N-末端重组核衣壳抗原 rNa(SEQ ID NO:2)在 BALB/c 小鼠中具有高度的免疫原性,在这些动物血清中发现的大量抗体证实了这一点,该抗体对用作疫苗(显示了 3 只动物)的抗原具有特异性。所用的疫苗有一个载体蛋白(GST),但制成载体蛋白的抗体却很少,当 GST 加入到血清后在分析中显示不具抑制性虚线)。相反重组刺突抗原 rSa(SEQ ID NO:10)和 rSc(SEQ ID NO:18)在 BALB/c 小鼠中缺乏免疫原性,同时出现的抗体大多制成载体蛋白(GST 高度抑制)。

[0098] 图 6 显示了 10 个死于 SARS 的患者含有极少的 N-末端重组核衣壳抗原抗体,而其他存活的 SARS 患者含有大量的此种抗体。然而 IF 分析显示,死亡的患者却含有其它类型的抗体。这表明,核衣壳具有重要的保护作用,可用作疫苗。

[0099] 这些结果证明,因其高度抗原和免疫原性,核衣壳抗原在诊断和预防方法或评估 SARS 感染中有应用价值,并能用于制备预防性疫苗。

[0100] II. 制备核衣壳抗原

[0101] 如上所述,本发明中的核衣壳抗原可作为诊断试剂即预防药物中的活性成分。任意一种用途的抗原可从任何适宜的来源中分离,在一些具体实施方案中,还可通过本领域所述技术人员公知的技术来从头合成。对于药物,需要制备无病毒的抗原,因此重组方法是优选的,其中核衣壳抗原可与其它病毒成分分开表达。对于诊断性应用,对从生物样品(患者样品)或感染的培养产物中分离感染的病毒颗粒来讲,重组方法同样具有有益健康的作用。

[0102] A. 从 SARS 感染患者和真核细胞系中分离抗原

[0103] 从 SARS 感染患者中收集的液体样品,虽然危险,但提供了一个现成的适用于本发明的核衣壳抗原来源。含 SARS 病毒颗粒的适宜的生物样品包括但不限于:全血、血清、血浆、脑脊液、初乳、淋巴液、乳液、唾液、尿、鼻拭子、眼泪、粘液性腹水、精液、排泄物、痰、胎儿液等。一旦从患者中获得样品,应用本领域已知的技术对所需抗原进行分离。适于分离核衣壳抗原的技术实例将在下文作详细描述。

[0104] 在一些具体实施方案中,将 SARS 病毒感染的培养细胞作为核衣壳抗原来源。可使用任何适宜的能够产生 SARS 病毒产物的真核细胞,但优选 Vero 猴细胞。在本发明的实施过程中,可使用任何适宜的培养方法和培养基来进行细胞培养。适宜的培养方法为本领域所属技术人员所公知和理解。可使用含血清和无血清的培养基。针对细胞类型,可适当使用分批和连续培养方法、悬浮和贴壁、例如微载体培养方法、摇动灌和空气提升发酵桶等培养方法。

[0105] 在悬浮培养中,感染的细胞可生长到一定的密度或到达最大的细胞密度,或在贴壁培养中到达融合的状态,此时它们应转移到维持培养基中。

[0106] 可用酶联免疫吸附分析或放射免疫分析等适宜本发明特定蛋白的常规分析技术来监测培养中的蛋白产物。如果必需,通过去除外来物质特别是细胞和病毒来源的分子来对该蛋白进行纯化。

[0107] B. 核衣壳抗原重组产物

[0108] 本发明可使用真核和原核蛋白表达系统,其结构是本领域普通技术人员公知的。尽管如此,本发明优选的具体实施方案惊奇地发现,在细菌中表达的核衣壳蛋白 N 末端片段可被 SARS 感染所产生的抗体识别。而且细菌中表达的核衣壳抗原能够产生抗 SARS CoV 的免疫反应。以下部分对制备本发明优选的细菌表达系统提供了附加教导。

[0109] 1. 核酸合成

[0110] 可使用任何适宜的本领域所属技术人员公知的方法来构建本发明中的编码核衣壳抗原的核酸。揭示使用重组技术分离天然核衣壳编码核酸方法的基础教科书包括 Sambrook 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990) 及 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 等, eds., 1994)。

[0111] 根据 Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859-1862 (1981) 首次描述的固相氨基磷酸三酯 (solid phase phosphoramidite triester) 法,利用 Van Devanter et. al., *nucleic acids Res.*, 12:6159-6168 (1984) 所述的自动合成仪,可化学合成核酸。通过天然丙稀酰胺凝胶电泳或 Pearson & Reanier, *J. Chrom.*, 255:137-149 (1983) 所述阴离子交换 HPLC 方法纯化核酸。

[0112] 除天然核酸编码的核衣壳抗原外,本发明还包括不同于天然序列的诸如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的核衣壳抗原编码核酸。本发明的实施例包括了与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 或二者具有 75%,更优选 80%、85%、90%,最优选 95%、98%、99%、100% 核酸序列一致性的核衣壳抗原编码核酸。如果需要,本领域所属技术人员可认识到有许多方法可对给出的核酸序列进行改造。该公知方法包括定点突变、利用简并核酸的 PCR 扩增、将含该核酸的细胞暴露于致突变试剂或放射线中、化学合成所需核酸(如与联

接体连接和 / 或克隆产生大的核酸) 以及其它公知的技术。参见如 Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook 等, Molecular Cloning—A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N. Y., (Sambrook) (1989); 和 Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel 等, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel); Pirmng 等, U. S. Pat. No. 5, 143, 854; and Fodor 等, Science, 251:767-77 (1991)。

[0113] 本发明中的核酸包括共价结合到功能基团, 如第一或第二羟基上的共轭基团。本发明中的共轭基团包括嵌入物 (intercalator)、报告分子、聚胺、聚酰胺、聚乙烯、乙二醇、聚醚、能够增强低聚物药效学特性的基团、及能够增强低聚物药物动力学特性的基团。一般的共轭基团包括胆固醇、脂质、磷脂、生物素、吩嗪 (phenazine)、olate、菲啉 (phenanthridine)、蒽醌 (anthraquinone)、吡啶 (acridine)、荧光素、若丹明 (rhodamines)、香豆素和染料。本发明所述的能够增强药效学特性的基因包括, 促进低聚物摄取、增强低聚物抗降解和 / 或强化与 RNA 序列特异杂交的基团。本发明所述的能够增强药代动力学的基因包括, 促进低聚物摄取、分布代谢或排泄的基团。代表性的共轭基团如 1992 年 10 月 23 日提交的国际专利申请 PCT/US92/09196 中揭露的基团, 其全部揭露在此引入作为本文的参考。

[0114] 例如, 将胆固醇共价连接到一个核酸上能促进 5 倍-10 倍的细胞摄取能力, 进而使 DNA 的结合提高约 10 倍 (Boutorin 等, 1989, FEBS Letters 254:129-132)。细胞表面的配体可具有促进细胞摄取的作用, 包括如胰岛素、转铁蛋白及其它。相似地, 以多聚 L-赖氨酸衍生的寡核苷酸能够辅助细胞对核酸的摄取 (Schell, 1974, Biochem. Biophys. Acta 340:323, and Lemaitre 等, 1987, Proc. 15 Natl. Acad. Sci. USA 84:648)。

[0115] 本发明中的核酸序列可以通过如 Wallace 等, Gene, 16:21-26 (1981) 中所述的用于双链模板测序的链终止方法或通过如 Maxam and Gilbert (1980) in Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, New York, Methods in Enzymology 65:499-560 中所述的化学降解法来进行验证。短的寡核苷酸序列可通过激光解吸质谱或通过快原子轰击方法 (McNeal 等, 1982, J. Am. Chem. Soc. -104:976; Viari 等, 1987, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14:83; Grotjahn 等, 1982, Nuc. Acid Res. 10:4671) 来进行分析。对于 RNA 寡核苷酸可采用相似的测序方法。

## [0116] 2. 感受态细菌表达系统及构建

[0117] 一旦其可操作性地连接到对所选择的宿主有机体适宜的表达系统中时, 编码核衣壳抗原的核酸可在多种宿主有机体内表达。适宜的表达系统通常包括宿主有机体内可操作的调控序列。这些调控序列对于可操作性地连接到特定核酸上来控制其表达是必需的。当有特殊应用需要时, 可选择地, 该表达系统还可包括其它调控、复制或操作序列来辅助表达和将该核酸与表达载体整合。

[0118] 例如, 为了使核衣壳抗原在原核系统中获得高水平表达, 构建的表达载体最低必需含有一个强的启动子来指导转录、一个翻译起始的核糖体结合位点、一个转录翻译终止子及在允许外源核酸插入的质粒的非必要区的唯一酶切位点。表达载体中还可包

括其它的因子,例如,如下所述的可选择和 / 或可计分的标记,本发明所用的适宜的表达系统为本领域所属技术人员公知,参见如 Pouwels 等 (1985 and Supplements) Cloning Vectors :A Laboratory Manual, Elsevier, N. Y. ;Rodriquez 等 (eds.) Vectors :A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston, 1988 ; Luckow, V. A. and Summers, M. D. , Bio/Technology, 6 :47-55 (1988) ; Herskowitz, I. and Hagen, D. , Ann. Rev. Genet. , 14 :399-445 (1980) ; 和 Yanofsky, C. , J. Bacteriol. , 158 : 1018-1024 (1984)。

[0119] 适宜本发明使用的细菌宿主有机体的例子是本领域技术人员所公知的,包括诸如大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) (参见 Sambrook 等, 见上文) 的革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌。大肠杆菌菌株是重组核衣壳抗原表达特别优选的宿主有机体。大肠杆菌菌株的例子包括 BL21 (DE3)、BL21-Gold (DE3)、BL21 (DE3)-pLysS (Stratagene)、MMLV-RT :JM 109、DH5.  $\alpha$ . f' (XL1BLUE **STRATAGENE**<sup>®</sup>, San Diego, Calif)、JM105、ER1458、NM 522、In  $\alpha$  f' (Invitrogen, San Diego, Calif.)、TOPP<sup>™</sup>. strains 1-6 (**STRATAGENE**<sup>®</sup>)、1200、MRE 600、Q13 和 A19。其中一些菌株 (1200、MRE 600、Q13 和 A19) 是与野生菌 (Durwald 等, 1968, J. Mol. Biol. 34 :331-346 ; Clark, 1963, Genetics 2548 :105-120 ; Gesteland, 1966, J. Mol. Biol. 16 :67 ; Reiner, 1969, J. Bacteriol. 97 :1522) 比较能够减少 RNase I (referred to as " RNase I deficient" ) 水平的突变体,而其它的菌株是一般的实验室菌株。其中一些菌株含有乳酸 I<sup>q</sup> 抑制剂并需异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 来诱导转录。含有 RT 基因的宿主细胞的 RT 表达水平可通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳观察产物蛋白,同时在大多数情况通过天然细胞裂解液的酶活性分析来估测。RNase I 缺失菌株大肠杆菌 1200 (菌株 4449, 从 *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University 获得) 通过这些检测显示出持续高水平的酶表达。除非有相反的指示,本文所述的所有实验均采用这一菌株进行。

[0120] 使用标准转染方法诱导核衣壳抗原表达系统进入宿主有机体 (参见如 Morrison, J. Bact. , 132 :349-351 (1977) ; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology, 101 : 347-362 (Wu 等, eds, 1983) ; Sambrook 等, and Ausubel 等, 见上文.)。通过本文所述的标准蛋白纯化技术从细胞或培养液中还原所述蛋白。

### [0121] 3. 可选择性标记基因

[0122] 鉴定成功整合了本发明的所述核衣壳抗原的宿主有机体优选地是通过将一个可选择性标记基因加入到用来产生核衣壳抗原编码序列的载体或表达系统中来实现的。通过选择或筛选转化 DNA 中标记基因编码的工程物质,该可选择性标记可以用来鉴定或分离转化的细胞、组织或动物。例如,用含抑制量的抗生素的培养基培养构建的细胞来进行选择,从而使转化了标记基因的构建体产生抗生素抗性。此外,还可通过检测存在于本发明的重组构建体中的任意可视标记基因 (例如,  $\beta$ - 葡糖醛酸酶、绿色荧光蛋白、荧光素酶、B 或 C1 基因) 的活性来鉴定转化细胞。这种挑选和筛选的方法是本领域所属技术人员所公知的。

[0123] 可以用物理或生化的方法来检测含有本发明的基因构建体的细胞转化株。这些方法包括但不限于 :1) 检测或确定重组 DNA 插入结构的 Southern 分析或 PCR 扩增 ;2) 检测或检验该基因构建图的 RNA 转录的 Northern 印迹、S-1RNase 保护、引物延伸或反转录 PCR 扩增 ;3) 检测酶活性的酶分析,如果所述的基因构建体编码此基因产物 ;4) 蛋白凝胶电泳、Western 印迹分析、免疫共沉淀、或酶联免疫分析,其中基因构建的产物是蛋白 ;5) 化合物

的生化检测,该化合物是诱导基因构建表达的产物。这些分析所用方法均是本领域所属技术人员所公知的。

#### [0124] C. 蛋白纯化

[0125] 通常在启动子诱导后,转化的细菌可大量表达重组核衣壳抗原;但表达可以是组成型的。IPTG 的启动子诱导是诱导性启动子系统的一个实施例。依据本领域的标准方法来培养细菌。可使用新鲜或冻存的细菌来进行核衣壳抗原的分离。

[0126] 细菌中表达的核衣壳抗原可形成不溶的聚集体(“包含体”)。一些方案适宜于从包含体中纯化核衣壳抗原。例如,包含体的纯化通常包括通过如在 50mM Tris/HCl pH 7.5、50mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、0.1mM ATP 和 1mM PMSF 的缓冲液中破裂细菌细胞来对包含体进行提取、分离、和 / 或纯化。通过一个 French Press 对细胞悬液进行 2-3 次裂解,用 Polytron (Brinkman Instruments) 或超声在冰上匀化。可选择的裂解细胞的方法是本领域所属技术人员所公知的(参见如 Sambrook 等,见上文;Ausubel 等,见上文)。使用标准的技术(例如参见 Colley 等, J. Biol. Chem., 264:17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)) 可纯化裂解液中的 OFP。

[0127] 如果需要,可溶解上述包含体,并通常通过离心来去除裂解细胞悬液中不要的不溶物质。包含体中的核衣壳抗原可在适合的缓冲液中通过稀释或透析来复性。适合的溶剂包括但不限于尿素(约 4M-约 8M)、甲酰胺(至少约为 80%, 体积 / 体积百分比)和盐酸胍(约 4M-约 8M)。一些可溶解聚集形式的蛋白的溶剂,例如 SDS(十二烷基硫酸钠)、70% 蚁酸,因其可造成所述蛋白的不可逆变性并伴有免疫原性和活性的缺失,因此它们均不适用于此步骤。尽管盐酸胍和相似的试剂是变性剂,此变性剂在移去(如透析)或稀释时,此种变性是可逆的并可发生复性,能够使免疫学和或生物活性蛋白得到重塑。其它适宜的缓冲剂为本领域所属技术人员所公知。

[0128] 可选择的,可从细菌的外周胞质中纯化核衣壳抗原。当核衣壳抗原输出到细菌的外周胞质中时,可通过冷冻渗透休克并辅助其它本领域技术人员已知的方法分离该外周胞质。例如,从外周胞质中分离核衣壳抗原可包括离心细胞形成沉淀;在含 20% 蔗糖的缓冲液中重悬沉淀;裂解细胞,离心,随后在冰预冷的 5mM MgSO<sub>4</sub> 中重悬该沉淀,并在冰上保持该制备产物约 10 分钟。离心该细胞悬液,倒出上清并保存。通过本领域所属技术人员所公知的和如下所述的标准分离方法能将上清液中的核衣壳抗原从宿主蛋白中分离。

#### [0129] D. 标准纯化技术

##### [0130] 1. 超滤

[0131] 通过不同孔径的膜(如 Amicon 或微孔膜)可将核衣壳抗原从大于或小于其分子量的蛋白中超滤分离。第一步,通过一定孔径的膜来对该蛋白混合物进行超滤以除去低于目的蛋白分子量的蛋白。随后通过膜来对超滤剩余的蛋白混合物进行超滤以去除高于目的蛋白分子量蛋白的蛋白。所述的核衣壳抗原将通过该膜进入滤出液。通过如下所述的方法对滤出液进行色谱分离。

##### [0132] 2. 交换色谱

[0133] 也可根据网表面电荷、疏水作用及配体亲和作用来从其它蛋白中分离核衣壳抗原。此外,抗核衣壳抗原的抗体可共轭连接到柱子的基质上从而使该抗原免疫纯化。这些

方法均是本领域所属技术人员所公知的。根据制造商的不同（如 Pharmacia Biotech），可使用任意方式或设备来进行色谱技术，这对本领域所属技术人员来说是显而易见的。

### [0134] 3. 标签技术

[0135] 纯化片段或“亲和标签”可融合到核衣壳抗原的适当部位来辅助分离和产生。通常此“融合蛋白”由连接到核衣壳抗原核酸编码序列框架中的亲和标签核酸编码序列而产生。通过裂解连接序列，一个亲和标签可融合到核衣壳抗原。例如，通过蛋白酶移去序列，一个 FLAG 序列或功能等价物可融合到核衣壳抗原上，使亲和剂能够识别 FLAG 序列，并且纯化的蛋白由蛋白酶消化而除去其延伸部分。有许多其它等价物片段，例如谷胱甘肽-S-转移酶（GST）对谷胱甘肽和多聚组氨酸片段有高度亲合性，这些片段对重金属柱试剂具有亲合性。如参见 Hochuli, *Chemische Industrie*, 12:69-70 (1989); Hochuli, *Genetic Engineering, Principle and Methods*, 12:87-98 (1990), Plenum Press, N.Y.; and Crowe 等 (1992) *OIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System*, QIAGEN, Inc. Chatsworth, Calif.; 在此引为参考。

### [0136] 4. 电泳和 PAGE/ 印迹纯化技术

[0137] 可使用天然的聚丙烯凝胶电泳来将本发明的核衣壳抗原纯化。简单地讲，该技术包括通过在通常为 Tris-HCl 碱的碱性缓冲液中适量混合丙稀酰胺和双丙稀酰胺来制备聚丙烯酰胺凝胶板，并使该混合物在一对平行玻璃板所形成的空间内聚合。通过改变混合物中丙稀酰胺的用量，使凝胶板可适于特定分子量范围蛋白的分离。对于核衣壳抗原，优选的丙稀酰胺浓度为 6% -15%，更优选 8% -12%，理想为 10%。凝胶正常放置，并以垂直位置来跑胶，由作用于凝胶板的电流来驱动蛋白的移动以产生凝胶的蛋白筛选作用，从而分离蛋白（参见 Schagger 等, *Anal. Biochem.*, 166:368-379 (1987)）。

[0138] 从凝胶中切下含核衣壳抗原的条带，将该分离胶条放入去除适当分子量的透析袋中，该透析袋中含有 pH 值优选 7-9 的缓冲液，更优选 7.5-8.5。将该透析袋放置在一平坦的平行于电流方向的电泳床上。用与透析袋中相同的缓冲液充满该电泳槽。电泳运行数小时，优选过夜，采用 5-50 伏的低电压，更优选 15-30 伏（依据使用的实际情况，特别是仪器中使用的缓冲液组成）。

[0139] 将含有上述核衣壳抗原的凝胶片置于平板凝胶电泳仪的低压和电流下，该蛋白从凝胶中移出，而进入透析袋的缓冲溶液中。一旦电泳完成，就移出空白凝胶，用本领域的任一种浓缩方法来浓缩该核衣壳抗原。

[0140] 上文所述的方法中所用的所有化学物质和仪器在现有的科学文献中都有描述，可以通过科技目录获得。（参见，如 Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Ausubel 等, (1987 年和周期性的修订本); *Current Protocols in Molecular Biology*; Deutscher (1990) “Guide to Protein Purification” in *methods in Enzymology* vol. 182 和这个系列的其它卷; 和制造商的关于使用蛋白纯化产物的著述，如 Pharmacia, Piscataway, N. J. 或 Bio-Rad, Richmond, Calif. 和 Sambrook 等, 见上文）。

[0141] 作为一可选步骤，用本领域公知的 Western 印迹技术，可以将用垂直凝胶电泳法分离的核衣壳抗原转移到尼龙膜或 PVDF 膜等上。然后可以将含有核衣壳抗原的膜部分分离用于纯化。参见 Mozdanzowsky 等, *Electrophoresis*, 13:59-64。

### [0142] III. 用本发明检测 SARS CoV

[0143] 本发明的某些具体实施方式提供了检测特异于 SARS CoV 的抗原的方法,与现有的 SARS 诊断测试相比其在灵敏性和使用的容易性方面要优越得多。这些方法的优点在于本发明的核衣壳蛋白具有意想不到的免疫活性。本发明的核衣壳抗原包括与 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 或两者具有至少约 75%,更优选至少约 80%、85%、90%,最优选至少约 95%、98%、99%、100% 序列同源性的肽或蛋白。另外,不同来源的核衣壳抗原,包括重组的和合成的都包括在本发明的范围之内,只要重组的核衣壳抗原对 SARS 感染的患者血清表现出与病毒粒子中分离出的核衣壳抗原相当的免疫原性。

[0144] 本发明的一些方法具有某些特征。例如,本发明中的方法提供了一个固定核衣壳抗原的支持物。在这些方法中,该固定的核衣壳抗原与诸如怀疑已受到 SARS CoV 感染的患者的血清生物样品接触。核衣壳抗原与生物样品接触后优选一个洗涤的步骤来去除松散和非特异的结合物质。如果患者已经受到 SARS CoV 的感染,患者的生物样品将含有能特异结合该核衣壳抗原的抗体,已经表面该抗原是最具免疫反应性的 SARS 抗原(参见下述的实例)。结合于该核衣壳抗原的抗体可用特异性识别该抗体的结合部分来识别。结合部分的例子包括抗体、Fab 和 F(ab)<sub>2</sub> 片段、智能配体 (aptamers) 等。在一些具体实施方案中,为了辅助检测,对结合部分进行标记。

[0145] 该部分是紧接本发明前述内容,对本发明中的诊断方法和所揭示方法中使用的适宜标志进行了详尽的描述。

[0146] A 分子标记

[0147] 本发明分析中使用的特定标记或检测基团并不是本发明的关键部分,只要其不明显干扰本发明检测中使用的核酸或蛋白的特异性结合。在需要标记的那些具体实施方案中,被检测的基团可以是具有可检测的物理或化学特性的任意物质。这些可检测性标记已经得到很好的发展,该方法中使用的任何一种标记都可用于本发明。因此,一个标记可以是任意一个能用分光光度、分光光度、光化学、生物化学、免疫化学、电、光或化学的方法检测的组合物。本发明所用的标记包括磁珠(如 DYNABEADS™)、荧光染料(如荧光素异硫氰酸酯、Texas 红、若丹明及其类似物)、放射标记(如 <sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C 或 <sup>32</sup>P)、酶(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其它商业 ELISA 分析常用的酶)及诸如胶体金、染色玻璃或塑料珠(如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)的比色标记。

[0148] 可根据本领域公知的方法直接或间接连接标记。如上所述,根据敏感性要求、与化合物结合的容易程度、稳定性的要求、提供的仪器操作、放置的措施等因素对标记进行选择,可使用各种标记。

[0149] B 免疫实验

[0150] 本发明提供了基于免疫化学的诊断试验来检测 SARS CoV 感染的具体实施方案,。这些具体实施方案为技术人员提供了诊断 SARS CoV 感染的必需工具。在本发明的诊断实验中可使用任意核衣壳抗原,优选的是 SEQ ID NO :2 重组表达的抗原。尽管本领域所属技术人员能够意识到,可使用多种诊断和预测本发明所述核衣壳抗原的实验方法,但是如下所述,诊断实验的例子是基于 ELISA 和 Western 印迹方法进行的。

[0151] 1. 样品制备

[0152] 根据如下所述的诊断实验方法,可检测任意怀疑含有核衣壳抗原抗体的样品。优选地,检测的样品是诸如全血、血清、血浆、脑脊液、初乳、淋巴液、乳液、唾液、尿、鼻拭子、眼

泪、粘液、腹水、精液、排泄物、痰、胎儿液及其类似物的体液。考虑到所述实验的灵敏性,在试验前对样品进行高倍稀释是可能的和优选的。该稀释可以通过加入与各个样品、受试抗体和免疫抗原组合物相容的液体来进行,如果样品是血清,优选一种或多种液体进行稀释,该液体选自磷酸盐缓冲液、pH7.0-7.4(下文指“PBS”),含 TWEEN 20 的 PBS(下文指“PBS T”),含硫柳汞的 PBS T(下文指“PBS TT”),PBS TT(明胶)(下文指“PBSTTG”)和含牛丙种球蛋白的 PBS TTG(下文指“PBS TTGG”),优选地经过稀释。检测 IgG 抗体的稀释比例是约 1 : 50 到约 1 : 200。IgG 测试是优选的。根据检测的样品,优选的稀释比例也可以不同。

[0153] 当不需要对样品进行稀释时,认为较大的稀释比例可减少在缺乏核衣壳抗原-特异性抗体时形成抗原/抗体复合物的可能性。根据能够检测到阳性信号的适合的抗原抗体复合物阈值浓度,来决定稀释程度。

### [0154] 2. 核衣壳抗原制备

[0155] 优选的抗原混合物包括重组和合成的核衣壳抗原,及各种纯化的病毒提取物,其中核衣壳抗原片段具有一个在 SDS-PAGE 上约为 48,000、44,000 或 40,000 道尔顿的明显的分子量。从 SARS 感染细胞中提取的抗原混合物至少含有一种几乎所有 SARS CoV 菌株中存在的核衣壳抗原。因此,这种特异的结果,使得该抗原混合物能够用于血清学分析。优选富含核衣壳抗原或至少一种 48,000、44,000 或 40,000 道尔顿片段的抗原组合物。更优选,凝胶电泳后用考马斯亮兰标记,至少有 50%的组合物或至少 50%的片段的分子量为 48,000、44,000 或 40,000 道尔顿。在某些优选的实施方案中,其含量可达到 85%或更多。对于一些应用,抗原组合物基本上不含非 48,000、44,000 或 40,000 道尔顿鞭毛或特异分子量片段的污染性抗原是理想的。

[0156] 一个抗原组合物基本上不含非核衣壳抗原,当用 SDS-PAGE 电泳和适当的染色后,该抗原组合物能够显示与已知核衣壳抗原对应的单一的明显的条带,而没有明显可见的其他条带。

### [0157] 3. 含核衣壳和刺突糖蛋白抗原的融合蛋白

[0158] 本发明还提供了含核衣壳或刺突糖蛋白抗原氨基酸序列的融合蛋白。这些融合蛋白是 SARS CoV 的感染的诊断和治疗工具。

[0159] 本发明中的融合蛋白选自与 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 具有至少约 75%,更优选至少约 80%、85%、90%,最优选至少约 95%、98%、99%、100% 序列同源性的氨基酸序列,该 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :6 共价连接到一个含有氨基酸序列 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :18 的至少约 10 个、更优选至少约 12、14 或 16 个、最优选至少约 20 个连续氨基酸序列的免疫原性肽。本发明的融合蛋白功能定义为当静脉内导入到哺乳动物时,具有产生免疫反应的能力。核衣壳氨基酸序列可以是刺突糖蛋白序列的 N-末端或 C-末端。可以用合成的连接肽来连接 SARS 特异序列,例如,用 6-12 甘氨酸残基或甘氨酸和丙氨酸残基的混合物组成的短肽,也可考虑其他合成的连接物,本领域所属技术人员根据常规实验可以测定和合成。

[0160] 本发明中的融合蛋白可利用本领域所属技术人员公知的适当技术来合成,包括本发明所述的固相合成和重组技术。例如,利用本领域普通技术人员公知的分子生物学技术分离核衣壳和刺突糖蛋白核酸序列,然后用本领域所属技术人员公知的方法直接或通过编

码连接肽的核酸序列将这些核酸序列连接起来,并插入到如上所述适于核衣壳抗原的表达载体中。随后将表达载体导入到适宜的宿主细胞中,培养并表达融合蛋白。最后,收集并可选择地根据本文所述和本领域所属技术人员公知的方法从培养细胞中纯化融合蛋白。

[0161] 评价免疫原性肽引起的免疫反应的技术是本领域所属技术人员公知的。针对本发明的目的,当致敏的动物产生特异性识别 SARS CoV 刺突糖蛋白和核衣壳的抗体时,一个融合蛋白可在一个动物中产生一个免疫反应。当致敏动物中的血清识别该刺突糖蛋白和核衣壳的亲合性至少 2 倍、更优选 3 倍、最优选 5 倍、理想为 10 倍于该血清识别已导入到动物体内的标准抗原蛋白的亲合性时,出现“特异识别”。通过标准的 ELISA 技术检测特异识别,该技术在室温下使用生理 pH 和离子强度的缓冲液(即约 pH7.2 和 1N 离子强度)。

[0162] 本发明中的融合蛋白的使用与于本文所述的核衣壳抗原的应用一样。例如,该融合蛋白可用作鉴定患者样品 SARS-CoV 方法中的抗原试剂,并可作为免疫刺激剂和疫苗的反应试剂。

[0163] 4. 免疫化学分析的常规方法

[0164] 对于本发明的免疫化学分析步骤,与本发明有关的核衣壳抗原优选通过常规技术将其固定在固体支持物上。例如,可以将聚苯乙烯板与本发明相关的核衣壳抗原一起孵育,可选择地,例如可以将从凝胶电泳带中分离的核衣壳抗原通过已知的方法转移到一个硝化纤维素膜上。参见 Towbin 等,Proc. Nat'l. Acad. Sci., 76 :4350-54(1979);Burnette 等, Biochem., 112 :195-203(1981)。其它众多的将抗原结合到基本惰性的底物上的方法是本领域技术人员所公知的。

[0165] 本发明中结合的抗原优选与含有待测样品的高倍稀释液体接触,该样品用于呈现 SARS CoV 抗体。该核衣壳抗原和样品优选孵育至少 1 小时。当孵育步骤在或接近体温,即约 37°C 时,允许相对短的孵育时间。在其他的温度如 4°C 下孵育也是允许的,但通常要求延长孵育时间。在 37°C 下优选的孵育时间为约 10 分钟-约 90 分钟。随后漂洗结合的抗原来去除任何未结合的抗体,即那些该抗原的非特异性物质。优选地,用诸如 PBS T、PBS TT 或 Tris/TWEEN/NaCl/叠氮化物的缓冲液来漂洗。优选冲洗多次。

[0166] 在孵育过程中,核衣壳抗原特异性抗体与固定的核衣壳抗原结合从而产生抗原/抗体复合物。所有非结合的抗体在冲洗的步骤中基本上被除去。因本发明中核衣壳抗原的高度特异性,核衣壳抗原非特异性抗体在这一步骤中基本上被除去。自然地,如果待测样品不含核衣壳抗原特异性抗体,该固定抗原将基本上不与人抗体结合并在随后的抗原/抗体复合物检测中出现阴性的检测结果。

[0167] 可通过多种已知的方法对抗原/抗体复合物进行检测。优选的方法包括但不限于酶联免疫吸附血清分析、Western 印迹技术或直接的荧光分析。在一个具体实施方案中,使用了以脂质体为基础的检测,其中为了后续的检测,核衣壳抗原特异性抗体识别的抗原表达在脂质体上并与核衣壳抗原特异性抗体集合,更详细的解释见如下所述。

[0168] 通常,通过与标记的或其它可检测的特异于人免疫球蛋白的第二抗体接触来对复合了固定核衣壳抗原的核衣壳抗原特异性抗体进行检测。该标记的第二抗体特异于任意人抗体,优选特异于 IgG 或 IgA,最优选 IgG 的抗体。当怀疑患上急性血清转化时,做 IgM 测试是合适的。第二抗体优选与固定抗原孵育约 15 分钟到约 2 小时,优选在约 20°C -37°C 的条件下孵育 30 分钟到 60 分钟。随后用缓冲液(优选多次)冲洗核衣壳抗原来移去没有结合

的抗体。此时,除结合到所述抗原上的人免疫球蛋白上的标记抗体外,其它的标记抗体基本上被移去。可通过检测第二抗体存在或不存在来直接分析核衣壳抗原特异性抗体的存在。有多种用于检测标记的方法。如通过扫描在荧光素特定波长处的发光来检测荧光素标记抗体。可选择地,通过与适当的底物孵育并检测颜色的变化来检测酶标记。通过肉眼观察或设定为适当波长的分光光度计自动读数来对其进行检测。在 Western 印迹中,例如,当酶结合到第二抗体时,可检测到阳性的信号。与适当的底物孵育后,此过程可由酶作用产生一个表示抗原条带的显色产物。可通过肉眼观察来检测反应条带的存在。在间接的免疫荧光分析中,可通过荧光激发探测仪或通过肉眼观察来检测荧光素标记的第二抗体。

[0169] 基于脂质体的分析法可以包括在脂质体内存在荧光素、酶或底物,在脂质体表面呈现核衣壳抗原。脂质体与适当稀释的待检体液样品共孵育,并彻底洗涤。与其表面的人免疫球蛋白形成抗原/抗体复合物的脂质体可通过使第二抗体与聚苯乙烯管内壁的特异人 Ig 作用来识别。抗体结合核衣壳抗原的那些脂质体将是固定的,而未固定的脂质体将被洗掉。可用去污剂或补体来溶解该脂质体,并且在内部的酶或底物不与管中溶液互补底物(或酶)反应。反应出现的颜色可通过肉眼观察或分光光度计来检测。可选择地,通过荧光激发探测仪来检测荧光素。

[0170] 本发明抗体的敏感性和特异性可用已知人群的血清来确定。这些结果在图 2 有显示并在本发明说明书的实施例中进行描述。

[0171] 上述通用方法中分析方法的两个例子为 Western 印迹分析和 ELISA 分析。在本发明说明书的实施例中,对这些方法的每一个进行了较详细的描述。

[0172] C. Western 印迹 (WB) 方法

[0173] 如上所述,基于免疫化学的诊断分析的具体实施方案例子包括如本领域所属技术人员公知的基于 western 印迹的方法。尽管用于本发明的核衣壳抗原制剂是以复合混合物的形式产生的,如以 SARS CoV 感染细胞的细胞裂解液的形式产生,本发明优选提供的检测方法,其中的核衣壳抗原为重组体,最优选为通过本领域所属技术人员公知的技术纯化的同质性或近同质性的抗原。

[0174] 在传统的 Western 印迹分析中,将目的抗原混合物溶解,通常用十二烷基硫酸钠 (SDS)、尿素及可选择地,使用诸如 2-巯基乙醇的还原剂来溶解。溶解后,该物质例如通过聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离。随后抗原被电转移至诸如硝化纤维素膜的固体支持物上,其中它们的结合是不可逆的。此步骤参见 Gordon 等, U. S. Pat. No. 4, 452, 901 issued Jun. 5, 1984 所述。

[0175] 上述蛋白的电转移在合适的固体支持物上产生剪切胶排列的忠实复制。通过与非特异性蛋白共孵育而使该固体支持物的剩余吸附能力达到饱和后,对该抗体进行这种转移的电泳图分析。因电泳位点的特异蛋白与用来阻断支持物上剩余的结合位点的非特异蛋白不发生交换,用电泳转移进行免疫分析是可行的。因与抗血清和指示剂抗体更多的接触并不产生诸如与吸附的非特异蛋白交换的副反应,因此结合抗原与用来阻断剩余吸附位点的非特异蛋白间的不干扰就能够延长孵育时间。

[0176] 上述固体支持物可以是具有足够的能使检测抗体进入的表面孔以和能与核衣壳抗原结合的适合的表面亲和性的任何材料。通常优选微孔结构,但也可使用水化的凝胶结构的材料。可用的固体支持物包括:天然聚合碳水化合物及其合成的变体、交联或取代衍

生物, 诸如琼脂、琼脂糖、交联藻酸、取代和交联瓜耳树胶、纤维素脂、特别是含硝酸和羧酸的、混合的纤维素脂和纤维素脂; 诸如蛋白和衍生物的含氮天然聚合物、包括交联或改造的明胶; 诸如乳胶和橡胶的天然的碳水化合物聚合物、制备有适宜的孔结构的合成的聚合物、诸如乙烯基聚合物包括聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯及其部分水解衍生物、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、诸如聚酯、聚酰胺的上述缩聚物的(二元)共聚物和偏三元共聚物及其它诸如聚亚氨酯、聚环氧化物的聚合物; 诸如碱性矿金属和镁的硫酸盐和碳酸盐的多孔无机材料, 包括硫酸钡、硫酸钙、碳酸钙、碳酸镁、碱性硅酸盐和碱性矿金属、铝和镁; 诸如粘土、氧化铝、滑石、瓷土、沸石、硅胶或玻璃的氧化或氢氧化铝或硅(这些材料与上述聚合材料可用于填充物); 及上述类别的混合物或共聚物, 诸如通过用已存在的天然聚合物来聚合合成的嫁接共聚物的聚合物。

[0177] 所有这些材料可以以合适的形状, 如膜、片或板使用, 或其可包被、结合或层压到适当的诸如纸、玻璃、塑料膜或织物的惰性载体上。

[0178] 固体支持物优选以约为 0.01-0.5mm 厚度片的形式使用, 最好约为 0.1mm。孔径可在一定的范围内变化, 优选约 0.025-15 微米、特别优选约 0.15-15 微米。

[0179] 通过化学步骤可活化这些支持物的表面, 使得抗原或免疫球蛋白可共价连接到支持物上。通常, 利用不易理解的疏水作用使其吸附在多孔的材料上, 从而产生不可逆的抗原或抗体的结合。优选的支持物是 Millipore, Bedford, Mass., USA 公司销售的商品名为 **Millipore®** 的硝化纤维素。适宜的支持物还如 1988 年 8 月 23 日提交的美国专利 No. 7/227, 272, 在此引入作为参考。

[0180] 一旦核衣壳抗原结合到固体的多孔支持物上, 在用于免疫分析之前, 该多孔材料必须进行处理以阻断多余结合位点。通过将含有抗原多肽的支持物与非特异性蛋白或含此蛋白的混合物、或未感染 SARS CoV 的个体全血清或这些成分独自或组合进行孵育来实施阻断。唯一的限制是这种蛋白不与免疫检测中的任何抗体或核衣壳抗原产生干扰或交叉反应, 这不同于支持物上的蛋白。剩余吸附位点的阻断也可在如下步骤中进行。

[0181] 例如, 在初始步骤中, 含固定核衣壳抗原的支持物可与蛋白组分材料孵育。此蛋白先在缓冲液中稀释, 然后与支持物孵育。此初始处理后, 仍有在免疫分析前没有完全阻断但还需阻断的结合位点。如果因剩余的结合位点而产生背景吸附, 就应使用附加阻断剂孵育来预防其发生。这些混合物的使用, 不仅能阻断剩余结合位点, 而且通过竞争, 防止与事先结合到非特异位点上的蛋白发生抗体交换、或防止任何与免疫球蛋白的非特异作用。

[0182] 为检测识别所述 SARS CoV 核衣壳抗原的抗体, 将上述固体支持物与根据希望的抗体浓度而用阻断溶液稀释的样品一起孵育, 通常的稀释约为 1:50 到 1:200, 在室温下约 2 小时或 4℃ 过夜, 然后用缓冲液洗涤移去未结合的剩余抗体。随后将支持物与可检测的结合部分孵育, 例如, 与具有放射活性、荧光、发光标记或连接一个能够与底物产生颜色反应的酶的指示剂抗体孵育, 如上文所述。指示剂抗体通常用阻断溶液混合物稀释, 与支持物孵育约 2 小时, 并再次用缓冲液洗涤。含有抗体识别 SARS CoV 抗原的的适宜样品包括全血、血清、血浆、脑脊液、初乳、淋巴液、乳液、唾液、尿、鼻拭子、眼泪、粘液性腹水、精液、排泄物、痰、胎儿液及其类似物。

[0183] 支持物上抗核衣壳抗原抗体的检测可通过适宜的指示剂抗体、或通过补系统成分、或通过对核衣壳抗原-抗体反应敏感的连接酶系统来进行。适宜的指示剂抗体可以是

任何与人或动物免疫球蛋白反应、或只与一种诸如 IgG、IgM 或 IgA 的所希望的抗体种类反应的种类特异抗体、或这些特异免疫球蛋白的任何所希望的组合。

#### [0184] D. ELISA 方法

[0185] 本发明优选的免疫分析包括本领域公知的多种酶联免疫吸附分析 (ELISA), 特别优选的实施方案如以下实施例部分所述。本发明实施 ELISA 分析的步骤类似于上述核衣壳抗原结合固体支持物的步骤, 例如, 上述 Western 印迹分析所述的方法。简单讲, 将核衣壳抗原、优选 SEQ ID NO:2 或结合有核衣壳抗原序列的适当的肽固化于一个固体支持物上, 优选一个诸如聚苯乙烯微滴定板的小井的能表现蛋白亲和作用的表面。其它适宜本发明 ELISA 分析的固体支持物例子如上所述。例如, 可以将溶于约 90  $\mu$ l 适宜缓冲液中 (例如含 1% 毛地黄皂甙或其它乳蛋白溶液制剂的 PBS) 的约 10  $\mu$ l 的检测生物样品 (患者样品) 在放入每个微滴定小井中。对照小井可含正常血清 (例如已知的不含抗核衣壳抗原抗体的人血清)。

[0186] 如上述的分析, 可冲洗结合的核衣壳抗原以去除不完全吸附的物质, 将诸如牛血清白蛋白 (BSA)、奶粉的酪蛋白溶液、明胶、PVP、超阻断物或马白蛋白的核衣壳蛋白结合或包被到已知的将与待测的患者样品进行抗原性中和的小井上。如上所述, 这使固化表面的非特异吸附位点封闭, 因此减少了由患者样品中抗体对该表面的非特异结合而产生的本底。一段适当的包被时间后 (例如 3 小时), 用适宜的诸如 PBS 的缓冲液漂洗包被的小井几次 (例如 4-5 次)。然后干燥该小井平板, 或保持潮湿使用。

[0187] 随后将待测的患者样品与该固定表面接触来形成免疫复合物 (抗原/抗体)。该步骤优选的条件包括用诸如 BSA、牛丙种球蛋白 (BGG) 和磷酸盐缓冲液 (PBS)/Tween 的稀释剂来稀释该抗血清。这些附加的试剂同样能辅助减少非特异本底的产生。在优选约 20°C - 约 25°C 的条件下, 可孵育患者的样品 15 分钟 - 4 小时, 但是其它的温度/时间组合也是适宜的并可由本领域技术人员通过常规的实验来确定。孵育之后, 优选洗涤样品去除无关物质。一个优选的洗涤步骤包括用诸如 PBS/吐温或硼酸盐缓冲液的溶液来冲洗。

[0188] 可通过用抗核衣壳抗原抗体的特异性第二抗体处理来确定患者样品中抗核衣壳抗原抗体的存在, 方法与上述类似。该第二抗体通常优选特异于人的 IgG、IgM 或 IgA。该第二抗体优选地与一标记连接以辅助检测, 该标记优选为与适当的色源底物孵育产生颜色反应的连接酶。本发明所用适宜的标记是本领域所述技术人员公知的, 本发明的优选标记可对样品中抗核衣壳抗原抗体含量进行定量检测。例如, 使用过氧化氢酶为酶标记时, 通过与诸如尿素和溴甲酚紫或 2,2'-连氮-二-(3-乙基-苯噻唑啉 benzthiazoline-6-磺酸) [ABTS] 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的显色底物孵育, 可进行定量分析。随后的定量是利用例如可见光分光光度计检测颜色产生的程度来实现的。

#### [0189] IV. 治疗 SARS 感染的预防性药物

[0190] 本发明中的核衣壳抗原同样可适用于用来延缓症状性 SARS 发生, 优选完全阻止 SARS CoV 感染的预防性药物的用途。本发明实施方案中的特定的预防性药物采用肽为基础的疫苗形式, 该疫苗适于向人给药并促进足以能够抑制或防止初期病毒感染的免疫反应。本发明的其它药物是活疫苗。其中的每个实施方案如下面的详细描述。

##### [0191] 1. 药物组合物的组方

[0192] 本发明中的疫苗如果能用于人药或兽药将是有意义的。因此, 免疫的对象可以是

人或其它动物,例如饲养的动物包括奶牛、绵羊、猪、马、山羊和家禽(例如鸡、火鸡、鸭、禽、观赏鸟和鹅)、诸如狗猫的宠物;外来和/或动物园动物;及实验室动物包括小鼠、大鼠、家兔、豚鼠和仓鼠。

[0193] 作为药物使用,本发明的核衣壳抗原可单独使用或与其它分子结合使用。一个核衣壳抗原结合的具体实施方案包括脂质体,已鉴定该脂质体可作为辅助试剂在体内引起抗病毒抗原的初级 CTL。例如,软脂酸残基可附加到 Lys(赖氨酸)残基的  $\alpha$  和  $\epsilon$  基团上随后形成连接,通过一个或多个诸如 Gly、Gly-Gly-、Ser、Ser-Ser 或其类似物的连接残基连接到核衣壳抗原。该脂质体化的抗原能以微胶粒的形式直接注射,从而连接到脂质体中或在佐剂中乳化,如不完全 Freund 佐剂。在优选的具体实施方案中,特定作用的免疫原含有与赖氨酸(Lys)的  $\alpha$  和  $\epsilon$  基团连接的软脂酸,其通过如 Ser-Ser 的连接连接到核衣壳抗原氨基末端。

[0194] 另一个能引起 CTL 反应的脂的实施例是大肠杆菌脂蛋白,如三棕榈酰-S-甘油半胱氨酸麦角酸-丝氨酸(tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserine)(P3CSS),当共价连接到一个适当的肽上时,其能用于引起病毒特异性 CTL 反应。参见 Deres 等, Nature 342 :561-564(1989),在此引入作为参考。本发明中的核衣壳抗原可与 P3CSS 连接,例如向个体给予脂肽而引发对该靶抗原的初级 CTL 反应。此外,因为 P3CSS 与具有合适抗原决定部位的肽连接可引起中和抗体的导入,因此可混合这两个组合物以引起更有效地针对感染的体液和细胞的免疫反应。

[0195] 制备药物组合物的本领域所属技术人员应认识到怎样制备上述的肽和连接,来实现含可接受药物载体、特异疫苗的组合物药物用途。

[0196] 根据本领域公知的技术,核衣壳抗原还可与一个载体蛋白连接。参见如 M. F. Good, Science 235 :1059-1062(1987); and Palker, T. J., J. Immunol. 142 :3612-3619(1989)。能够与核衣壳抗原连接从而激发免疫反应的试剂包括通常由机体(免疫的人)识别并通过免疫系统消灭的类毒素或破伤风类毒素。可选择地,一个编码核衣壳抗原的核酸序列可连接到重组基因上并作为载体的一个部分来表达,例如,通过 Chakrabarti, S. 等, Nature 320 :535-537(1986) 所述方法制造的诸如牛痘病毒重组病毒表达。

[0197] 核衣壳抗原还可以与一大肽连接,该大肽含有其它的抗原决定部位,即 T 细胞抗原决定部位或是 B 细胞抗原决定部位。因此,核衣壳抗原可作为诱导细胞毒性 T 细胞对 SARS CoV 的或 SARS CoV 与另一种病毒的多种免疫抗原决定部位反应的多价疫苗来使用。此外,该多价疫苗肽可含有 SARS CoV 或另一病毒的辅助 T 细胞抗原决定部位和 B 细胞抗原决定部位,从而有效诱导抗体反应和细胞毒性 T 细胞反应。例如,诸如 Cease K. B. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :4249-4253(1987) 中所述的来源于 HIV 的上述物质可结合到辅助 T 细胞抗原部位,从而产生 CTL 反应的 T 细胞辅助作用。例如 Hart, M. K. 等, Proc Natl Acad Sci USA 88 :9448-9452(1991) 所述的产生抗病毒细胞毒性 T 淋巴细胞的肽;及 Hart, M. K. 等, J. Immunol. 145 :2677-2685(1990). Collett, N. S., V. Moennig, and M. C. Horzinek. 1989. Recent advances in pestivirus research. J. Gen. Virol. 70 :253-266. 所述诱导抗体反应的肽。

[0198] 发现刺突抗原相对缺乏免疫原性。因此,本发明的目的之一是提供较高免疫原性的刺突融合蛋白。在本发明的一个具体实施方案中,SARS-CoV 核衣壳抗原与刺突抗原结合,

形成一种核衣壳-刺突融合蛋白。在此融合蛋白中,核衣壳蛋白对刺突抗原起到一种佐剂的作用。核衣壳抗原与刺突抗原的融合过程如本文所述。

[0199] 在本发明的另一个具体实施方案中,刺突蛋白(rSa、rSb或rSc)可以是糖基化的,可以化学连接到其它诸如破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)或其它蛋白的其它免疫原载体上。可从含有糖基化酶的真核细胞的细胞培养物中获得糖基化的刺突蛋白。这些细胞系是本领域公知的。非糖基化的刺突蛋白可从细菌培养中获得。

[0200] 使用TT或D或其它蛋白的原则与使用核衣壳相同,该核衣壳在B细胞抗原决定部位识别结合该刺突糖蛋白时,产生T细胞抗原决定部位来起到佐剂的作用。以此所述的方式产生抗刺突抗体时,B细胞与T细胞通过各自的抗原相关决定部位激活反应因而都是必需的,它们在此过程相互协调发挥作用。TT和DT在细菌疫苗中用于相同的目的,来制备呼吸疾病致病细菌(明显地,如肺炎球菌、脑膜炎球菌及流感嗜血杆菌)来源的荚膜抗原,在婴儿中具有更明显的免疫原性(Posfay-Barbe, K Mand Wald, ER, Curr. Opin. Infect. Dis. 2004, 17(3):177-84; Rennels等, Pediatr. Infect. Dis. J. 2004, 23(5):429-35,其揭露在此引用作为参考)。这是因为婴儿的免疫系统不成熟,因此不能对包括此荚膜抗原的多糖产生反应,但对蛋白可产生相同的抗体。因这些抗原的免疫原性还没有被阐明,因此使用蛋白偶联作为SARS病毒抗原至今还没有报道。此处,我们强调病毒刺突蛋白(S)与TT或DT(或其它蛋白)偶联的潜在优点。

[0201] TT或DT是可辅助S在所有个体中具有更好的免疫原性的强免疫原。而且,TT或DT可在婴儿中辅助S产生免疫原性,因婴儿的免疫系统不成熟,因而对糖基化蛋白S不产生反应。目前在香港和世界的大部分地区,TT和DT已在儿童疫苗中普遍使用,同样地,许多个体已经接触过这些类毒素。这意味着,这些个体对这些类毒素的偶联体会迅速和有准备地产生反应。

[0202] 最重要的是,含有SARS病毒有效抗原的SARS疫苗可引发疾病而不是预防疾病,而TT或DT的使用可排除这种可能性。但其风险如何,还需在将来的实践中验证。这不同于疫苗的快速毒性反应如发热和疼痛。呼吸融合病毒(RSV)疫苗是臭名昭著的疾病加重疫苗的例子(Johnson, TR and Graham, BS, . Pediatr. Infect. Dis. J. 2004, 23(Suppl):S46-57,其揭露在此引用作为参考)。因SARS很大程度上是由过激的免疫反应引发的免疫病理性疾病,特别是包括了T细胞的参与,因此防止SARS感染还是重要的。通过使用TT或DT作为载体,可避免刺激性T细胞对给病毒抗原的反应。

[0203] 因此,本发明的一个优选具体实施方案中,该糖基化刺突蛋白rSa化学连接到破伤风类毒素(TT)上。在本发明的另一个具体优选的实施方案中,该糖基化刺突蛋白rSa化学连接到白喉类毒素(DT)上。

[0204] 因此,本发明的一个优选具体实施方案中,该糖基化刺突蛋白rSb化学连接到破伤风类毒素(TT)上。在本发明的另一个具体优选的实施方案中,该糖基化刺突蛋白rSb化学连接到白喉类毒素(DT)上。

[0205] 因此,本发明的一个优选具体实施方案中,该糖基化刺突蛋白rSc化学连接到破伤风类毒素(TT)上。在本发明的另一个具体优选的实施方案中,该糖基化刺突蛋白rSc化学连接到白喉类毒素(DT)上。

[0206] 可选择地,从细胞培养物中获得的糖基化刺突蛋白(rSa, rSb or rSc)可化学连接

到其它诸如 CpG-寡核苷酸 (CpG) 的免疫原载体上 (Tighe 等, Eur. J. Immunol. 2000, 30(7) : 1939-47 ;其揭露在此引用作为参考)。

[0207] CpG 是最近发现的可用于免疫系统的一种有效佐剂。其最初是疫苗混合物的目的抗原中的一种分离化合物,但最近其已用在与抗原连接实验中 (Tighe 等, Eur. J. Immunol. 2000, 30(7) :1939-47)。它可通过 Toll 样受体并介导 Th1 细胞的反应来刺激抗原提呈细胞 (特别是树突状细胞)。

[0208] 因此,本发明的目的之一是提供连接到 CpG 的 SARS 病毒抗原。在本发明的一个优选具体实施方案中,糖基化刺突蛋白 rSa 化学连接到 CpG 上。在本发明的另一个优选具体实施方案中,糖基化刺突蛋白 rSb 化学连接到 CpG 上。在本发明的另一个优选具体实施方案中,糖基化刺突蛋白 rSc 化学连接到 CpG 上。

[0209] 另外,其基本原理还是使较弱的 S 抗原更具有免疫原性。此处该 S 抗原同时在免疫系统中产生 B 细胞和 T 细胞抗原决定部位。但是,在一些连接中,S 抗原只产生 B 细胞抗原决定部位而不产生 T 细胞抗原决定部位。这可防止引起疾病加重的可能性。在此情况下,该 S 抗原缺乏 T 细胞抗原决定部位 (诸如含有最小的序列)。此种连接的 CpG 不刺激树突状细胞。而且分别通过 B 细胞受体和 Toll 样受体辅助 S 抗原共刺激相同的 B 细胞。所产生的抗体是 IgM 类,其作为第一道防线发挥作用。没有 T 细胞参与,这意味着不伴随炎症反应及没有记忆反应。

[0210] 针对本发明的目的,适合本发明疫苗制剂的核衣壳抗原是任意与 SEQ ID NO :2 氨基酸序列具有至少约 75%,更优选至少约 80%、85%、90%,最优选至少约 95%、98%、99%、100%序列同源性的肽或蛋白。

[0211] 针对本发明的目的,适合本发明疫苗制剂的刺突蛋白抗原是任意含有与 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :18 具有至少约 75%,更优选至少约 80%、85%、90%,最优选至少约 95%、98%、99%、100%序列同源性的氨基酸序列的肽或蛋白。

[0212] 一旦组方到药物中,本发明中的疫苗将引起至少 30%、更优选至少 40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的通过本领域所述定量 ELISA 检测或定量 CTL 分析检测的免疫反应。优选的疫苗成分可加入到疫苗中来增加其治疗效果、保存期或其它治疗组合物所需要的特性。优选的成分包括佐剂、缓冲剂、乳剂材料及其它类似物。

[0213] 2. 可给药的抗原肽

[0214] 本发明的核衣壳抗原在预防和 / 或治疗使用中倾向于肠道外、局部、口服或区域给药。优选地,核衣壳抗原通过肌肉内或鼻内给药。通过鼻气雾剂将肽组合物直接对肺给药的方法如美国专利 No. 5, 756, 353 和 5, 804, 212 (特别引用其全文作为参考) 所述。同样,鼻内微粒树脂药物 (Takenaga 等, 1998) 和溶血磷脂胆碱 - 甘油化合物 (美国专利 No. 5, 725, 871, 特别引用其全文作为本文的参考) 的给药也是本制药领域所公知的。同样,以聚四氟乙烯为支持基质的跨粘膜药物给药如美国专利 No. 5, 780, 045 所述。

[0215] 在 JP 309347/91 (优先权日 1991 年 11 月 25 日) 中,口服或鼻内给药免疫原组合物含有以 C6-C26 残基的饱和或不饱和脂肪酸甘油三酸脂为佐剂的具有免疫哺乳动物作用的免疫原。

[0216] 在 WO 94/17827 (优先权日 1993 年 2 月 15 日) 中描述了通过对哺乳动物粘膜局部抗原给药的药物制备方法。其佐剂 / 载体制备选自 : (a) 多聚氧乙烯山梨聚糖单酯, (b)

多聚氧乙烯蓖麻油, (c) 辛酸 / 癸酸甘油酯, 及 (d) 神经节苷酯。

[0217] 可选择的将核衣壳抗原溶于药物可接受的赋形剂中对患者给药, 优选水性赋形剂。可使用多种水性赋形剂例如水、缓冲液水、0.4% 盐、0.3% 甘氨酸及其类似物, 包括白蛋白、脂蛋白球、蛋白等的糖蛋白。根据接近生理条件的要求, 该组合物还可含有药物可接受的诸如 pH 调节和缓冲剂、张力调节剂及其类似物的辅助物质, 例如, 乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙等。

[0218] 对疫苗实现佐剂作用的方法包括使用诸如氢氧化铝或磷酸盐 (铝) 的试剂, 通常以占磷酸盐缓冲液或 QS21 溶液的 0.05% -0.1% 的浓度使用, 这样能刺激细胞毒性 T 细胞。还可使用能增强细胞或局部免疫的含不同佐剂的制剂。只要二者能够达到有效的剂量, 佐剂与抗原肽的相对比例可在一个较宽的范围内波动。例如, 氢氧化铝的含量可占疫苗混合物 ( $Al_2O_3$  为基础) 的约 0.5%。

[0219] 药物制备中核衣壳抗原的含量范围较宽, 即从约 0.001% 到 15% 或 20% 重量百分比不等, 并优先地根据溶液的体积、粘性等及特定的给药方式来选择。当使用肌肉内注射的注射溶液时, 治疗效应活性成分的免疫加强剂量约为 0.001% -0.01% 重量百分比。如果以片剂、胶囊或栓剂的形式制备, 活性成分以每个片剂、胶囊或栓剂中 0.1mg 的含量制备。在该剂型中, 片剂、胶囊或栓剂还可含有其它诸如填充物、淀粉、葡萄糖等的常规赋形剂和载体。制备肠道外、口服、局部给药化合物的实用方法是本领域技术人员显而易见的并在例如, Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) 中有详细描述。在此引入作为本文参考。

[0220] 治疗 SARS CoV 感染个体的核衣壳抗原有效剂量的确定可通过本领域所述技术人员常规使用的方法来进行, 详细描述见上文药物活性核酸部分。

[0221] 可以向已经感染的个体给予足够量的本发明的组合物来治疗或至少部分缓解疾病和其并发症。实现该目的的足够量定义为“治疗有效剂量”。根据需治疗患者的感染或疾病严重程度、体重及一般情况来确定其有效剂量, 但通常的剂量范围为: 每天约 0.001mg/kg-5000mg/kg 宿主体重的肽, 更优选每天约 0.1mg/kg- 约 1000mg/kg 宿主体重的肽, 常用每天约 0.25mg/kg- 约 100mg/kg 宿主体重的肽, 更常用每天约 0.5mg/kg- 约 20mg/kg 宿主体重的肽, 并优选每天约 0.7mg/kg- 约 10mg/kg 宿主体重的肽。如需要, 可以根据延长的时间来调整维持剂量。应注意, 本发明的材料可用于危重的疾病阶段, 即病危或潜在的病危状态。在这种情况下, 当一个人源性多肽用来治疗人宿主时, 考虑到外源物质的最小限量和通常的免疫原性缺乏, 对于治疗医生来说, 给予这些组合物基本超出的剂量是可能和必要的。

[0222] 在预防性应用中, 通过本发明所述方法对易感或有感染风险的患者给予本发明的组合物的治疗。此剂量定义为“预防作用剂量”。在此应用中, 同样根据患者的健康情况和体重来确定准确的剂量, 但通常为上述治疗使用的剂量范围。预防性给药对于那些有接触或有接触感染疾病风险的宿主是特别必要的, 例如健康护理人员、旅行者、感染个体的家庭成员、免疫抑制患者及其类似者。本发明中的肽还可用于外科预防性给药, 来减少感染性并发症易感性和增强宿主对失血的恢复反应。

[0223] 3. 核酸疫苗的制备

[0224] 本发明编码核衣壳抗原的核酸可作为适合 SARS 治疗的药物制剂的活性成分来使用。例如小抑制性 RNAs (siRNA)、核酶分子、反义核衣壳抗原 cDNA 序列和编码核衣壳

抗原都可以组方到适合抑制或防止 SARS CoV 感染的预防性药物中或加入有助于清除患者病毒的治疗中。制备此药物的方法是本领域所述技术人员公知的方法并可通过常规的实验方法来实现(参见,例如 Woodrow 等, *New Generation Vaccines: The Molecular Approach*, Eds., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y. (1989); Cryz, *Vaccines and Immunotherapy*, Ed., Pergamon Press, New York, N. Y. (1991); and Levine 等, *Ped. Ann.*, 22:719-725(1993); Tang, D. C. 等 (1992) *Nature* 356:152; Fynan, E. F. 等 (1993) *PNAS USA* 90:11478; Donnelly, J. J. 等 (1995) *Nat Med* 1:583; Wang, B. 等 (1993) *PNAS USA* 90:4156; Davis, H. L. 等 (1993) *Hum Mol Genet* 2:1847; Ulmer, J. B. 等 (1993) *Science* 259:1745; Robinson, H. L. 等 (1993) *Vaccine* 11:957; Eisenbraun, M. D. 等 (1993) *DNA Cell Biol* 12:791; Wang, B. 等 (1994) *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:S35; Coney, L. 等 (1994) *Vaccine* 12:1545; Sedegah, M. 等 (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9866; Raz, E. 等 (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9519; Xiang, Z. Q. 等 (1994) *Virology* 199:132)。

[0225] 一类新的细菌载体疫苗也可用于运输本发明的治疗性核酸(参见 Curtiss, In: *New Generation Vaccines: The Molecular Approach*, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., pages 161-188 and 269-288 (1989); and Mims 等, In: *Medical Microbiology*, Eds., Mosby-Year Book Europe Ltd., London (1993))。这些疫苗可口服、鼻内或非肠道给药浸入宿主。一旦进入宿主,该细菌载体疫苗就表达构建的原核表达盒,该表达盒含有可操作地与该表达盒的表达元件连接的真核核酸(参见,例如 *New Generation Vaccines: The Molecular Approach*, 见上文; *Vaccines and Immunotherapy*, 见上文; Hilleman, *Dev. Biol. Stand.*, 82:3-20(1994); Formal 等, *Infect. Immun.* 34:746-751(1981); Gonzalez 等, *J. Infect. Dis.*, 169:927-931(1994); Stevenson 等, *FEMS Lett.*, 28:317-320(1985); Aggarwal 等, *J. Exp. Med.*, 172:1083-1090(1990); Hone 等, *Microbial. Path.*, 5:407-418(1988); Flynn 等, *Mol. Microbiol.*, 4:2111-2118(1990); Walker 等, *Infect. Immun.*, 60:4260-4268(1992); Cardenas 等, *Vacc.*, 11:126-135(1993); Curtiss 等, *Dev. Biol. Stand.*, 82:23-33(1994); Simonet 等, *Infect. Immun.*, 62:863-867(1994); Charbit 等, *Vacc.*, 11:1221-1228(1993); Turner 等, *Infect. Immun.*, 61:5374-5380(1993); Schodel 等, *Infect. Immun.*, 62:1669-1676(1994); Schodel 等, *J. Immunol.*, 145:4317-4321(1990); Stabel 等, *Infect. Immun.*, 59:2941-2947(1991); Brown, *J. Infect. Dis.*, 155:86-92(1987); Doggett 等, *Infect. Immun.*, 61:1859-1866(1993); Brett 等, *Immunol.*, 80:306-312(1993); Yang 等, *J. Immunol.*, 145:2281-2285(1990); Gao 等, *Infect. Immun.*, 60:3780-3789(1992); and Chatfield 等, *Bio/Technology*, 10:888-892(1992))。

[0226] 检测核酸和蛋白疫苗效率的方法是是本领域普通技术人员公知的。

#### [0227] V. 试剂盒

[0228] 本发明还包括将本发明的诊断和药物具体实施方案装配为试剂盒以帮助实施本发明。例如,本发明检测 SARS-CoV 的试剂盒的具体实施方案含有一蛋白和教导使用该蛋白检测样品中的抗 SARS 抗体的说明,该蛋白含有与 SEQ ID NO:2 具有至少约 75%,更优选至少约 80%、85%、90%,最优选至少约 95%、98%、99%、100% 序列同源性的氨基酸序列。本发明的另一个试剂盒包括一与 SEQ ID NO:1 具有至少约 75%,更优选至少约 80%、85%、

90%，最优选至少约95%、98%、99%、100%序列同源性的核酸序列。所有此种核酸称为“核衣壳编码序列”。这些核酸和蛋白可与诸如塑料或玻璃表面、聚苯乙烯珠或其类似物的固体支持物作用。其它适宜的固体支持物如上所述的和本领域所述技术人员公知的其它物资。优选的固体表面是测量板形式，更优选试剂盒的核酸或蛋白通过装入小室在测量板上得以保护。

[0229] 本发明试剂盒可选择地包括一个收集患者样品的工具。根据所收集样品的属性来确定所用的工具，但可采用注射器、药签、纱布、小杯、试管或其它类似物的形式。使用本发明试剂盒的适宜的样品是根据特定试剂盒的组成而决定的。例如，包含 ELISA 分析测量方式的试剂盒可检测包括含抗核衣壳抗体的样品。适宜使用含核衣壳编码序列试剂盒的样品包括潜在含有 SARS CoV 核酸诸如全血、血清、血浆、脑脊液、初乳、淋巴液、乳液、唾液、尿、鼻拭子、眼泪、粘液、粘液性腹水、精液、排泄物、痰、胎儿液及其类似物的任意样品。

[0230] 试剂盒可选择地包括一个诸如指示剂抗体的结合部分，其可特异识别抗核衣壳抗原抗体，即一个连接鉴定标记的抗体。在 ELISA 或 ELISA 样方法试剂盒实施方案中，该选择是优选的。特别优选的指示剂抗体标记为识别底物的酶，该底物可被催化转变为显色产物。

[0231] 本说明书所引用的所有公开和专利申请此处都引为参考，如同各个公开或专利申请被单独说明和引用一样。

[0232] 尽管以往的发明为了清楚和便于理解，用例证和实例的方式作了一些描述，但在本发明的教导下，在不偏离本发明精神和权利要求范围的情况下，对本发明的任何改变或修改对本领域所属技术人员均是显而易见的。

[0233] 从上述的揭露中可看出本发明应用广泛。因此，所提供的实施例仅是为更好地说明本发明，不能理解为对本发明的限制。本领域所属技术人员能够理解，任何对非关键参数的修改和改变均可产生基本相似的结果。

## 实施例

[0234] 本发明证实 SARS CoV 的核衣壳蛋白是 SARS CoV 感染个体免疫反应所识别的主要抗原。本发明还确定核衣壳蛋白 N-末端的一半 (SEQ ID NO :2) 和 C-末端的一半 (SEQ ID NO :6) 是该免疫识别的部分。如本文所述，这两个蛋白部分具有防止 SARS 感染的诊断工具和预防药物的作用

[0235] 通用方法

[0236] 1. 细胞培养和病毒的产生

[0237] Vero (猴肾成纤维细胞) 细胞在含 5% 胎牛血清、100U/ml 青霉素 G、100g/ml 链霉素的 Dulbecco modified Eagle 培养液 (DMEM, Gibco BRL) 中, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的组织培养箱中培养。通过感染 Vero 细胞及在感染后 20-48 小时观测到显著的细胞病变 (CPE) 时, 收集上清来制备冠状病毒株 CUHK-W1。病毒在 -70°C 贮存备用。

[0238] 2. 用细胞培养物制备天然病毒抗原

[0239] 为制备天然病毒抗原, 在 8 个 Vero 细胞生成成为亚融合单层 (~90%) 的 75cm<sup>2</sup> 组织培养瓶中每个接种如上所述的 0.3ml 的 SARS 冠状病毒贮存物。感染后约 16-48 小时, 当观察到 50% 的细胞出现细胞病变作用 (CPE) 时, 倒出细胞悬液, 并以 450×g, 10 分钟离心沉淀细胞。细胞沉淀用 2.7ml 裂解缓冲液重悬, 并在冰上定期混合地孵育 1 小时。通过 4°C,

2000×g, 离心 15 分钟分离裂解液, 收集上清并在 55℃ 加热 30 分钟后贮存在 -70℃ 备用。从 3 个未感染的 Vero 细胞培养瓶中, 用相同的方法平行制备阴性对照抗原。

[0240] 为分离特异性病毒抗原, 通过 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离上述制备的天然病毒抗原并用考马斯亮兰标记和 Western 印迹来分析。通过 Western 印迹鉴定与刺突 (S) 和核衣壳相关蛋白 (N1, N2, N3) 大小匹配的胶条被切下并倒入一个电洗脱的洗脱池 (Amika, Columbia, USA) 中。用洗脱缓冲液 (含 0.5% SDS 的 Towbin 缓冲液), 40V、4℃ 过夜来洗脱蛋白并通过 Ultrafree-15 离心过滤装置 (10,000 道尔顿分子量去除, Millipore) 超滤浓缩到约 0.5ml。

[0241] 3. 重组核衣壳抗原的制备

[0242] 3a. 基因构建

[0243] 用 RNA 提取试剂盒 (Qiagen) 提取冠状病毒感染猴肾成纤维细胞的总 RNA, 并用 cDNA 合成试剂盒根据该试剂盒说明书通过随机锚定引物将其反转录。用适当的引物通过 PCR 对获得的 cDNA 进行扩增。根据公开的 SARS 冠状病毒株 CUHK-W1 (GenBank 登录号 AY278554) 序列, 针对冠状病毒核衣壳基因 (1-660 核苷和 630-1266 核苷) 设计引物 (Invitrogen)。含一个 BamH1 内切酶位点 (下划线) 的正向 (F) 引物及一个 EcoR1 内切酶位点 (下划线) 的反向 (R) 引物如下列出:

[0244] 基因名称 : rNa

[0245] SEQ ID NO : 3F-BNUpp1.1

[0246] 5' -CGTGGATCCATGTCTGATAATGGACCCCAA-3'

[0247] SEQ ID NO : 4R-BNLow2.1

[0248] 5' -CGATGAATTCGAGGGCAGTTTCACCACCTCC-3'

[0249] 基因名称 : rNb

[0250] SEQ ID NO : 5F-BNUpp3.1

[0251] 5' -CGTGGATCCGGAGGTGGTGAAGTGCCTC-3'

[0252] SEQ ID NO : 6R-BNLow1.1

[0253] 5' -CGATGAATCTGCCTGAGTTGAATCAGCAGA-3'

[0254] PCR 条件包括 94℃、3 分钟; 94℃、1 分钟, 55℃、1 分钟及 72℃、1 分钟, 34 个循环; 最后 72℃、15 分钟。用 1% 的琼脂糖凝胶来分析 PCR 产物, 用 QIAquick 的凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 来纯化产物并用 EcoR1 和 BamH1 酶 (New England Biolab) 进行限制性酶切。用凝胶纯化的分别酶切的 cDNA 片段联入到 BamH1/EcoR1 酶切的表达载体 pGEX-2T (Amersham Bioscience) 的多克隆连接位点。此载体编码一个连接有各自重组病毒蛋白的融合蛋白 [27,000 道尔顿, 谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)]。通过电转染的方法将该连接的载体转染到 BL21 细菌 (Amersham Bioscience) 中, 通过 PCR 观察该转化株并用 DNA 测序来证实该序列。

[0255] 3b. 细菌中谷胱甘肽 S 转移酶融合蛋白的表达

[0256] 为进行蛋白的表达, 将 100 μl 过夜培养的各自的转染株接种到含 50 μg/ml 氨苄青霉素的 50ml Luria-Bertani 培养基中 37℃ 连续摇动培养约 2.5 小时。当 600nm 的培养物光密度到达 0.9 时, 加入终浓度为 1mM 的异丙基 -β-D- 硫代半乳糖吡喃苷 (IPTG) 来诱导蛋白的表达。室温下继续培养细菌培养物 16 小时。为分离重组蛋白, 以 4℃、3500×g、20 分钟离心细菌获得沉淀, 2ml 冰冷的裂解液缓冲液重悬沉淀并在冰上孵育 1 小时。在冰上, 用

Branson (Danbury, CT) microtip 超声破碎仪, 输出 2-5, 工作循环 50%、3 个循环 (20 秒超声和 30 秒间歇) 的条件对其进行超声破碎后, 加入 200ml 10% Triton X-100 和 20ml 0.1M DDT 并将混合物在冰上继续孵育 30 分钟。以 4℃、11,000×g、10 分钟离心裂解液, 收集含有重组蛋白的上清液。使用亲和分离方法来分离重组蛋白。将 2ml 上清液与 100ml 连接有谷光甘肽的琼脂糖 (Amersham Biosciences) 室温下在转动混合器上混合 1 小时。用 1ml 裂解缓冲液洗涤该小珠 4 次后, 洗脱重组蛋白 3 次, 每次用 250 μl 洗脱缓冲液 (20mM 还原谷光甘肽、25mM Tris-HCl、100mM NaCl、0.1% Triton X-100、5mM DDT, pH 8.0) 室温下在转动混合器上洗脱 10 分钟。根据说明书指导通过 Ultrafree-15 离心过滤装置 (10,000 道尔顿分子量去除, Millipore) 将收集的部分超滤浓缩到约 100 μl。用 SDS-PAGE、考马斯亮兰标记和 western 印迹来分析并根据说明书指导用 BCA (Pierce) 分析来对其定量。

#### [0257] 4. 抗体鉴定检测

##### [0258] 4a. Western 印迹分析

[0259] 待测的蛋白样品与三分之一量的 4×SDS 加样缓冲液 (0.25M Tris-HCl [pH6.8], 20% 2-巯基乙醇, 40% 甘油, 8% SDS, 0.01% 溴苯酚兰) 混合, 100℃ 加热 5 分钟, 然后加样到 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上。用微型凝胶电泳系统 (Bio-Rad), 室温下 150V 电泳 80 分钟。用半干电转移印记系统 (Bio-Rad), 在 Towbin 缓冲液 (25mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol, pH 8.3) 中, 20V 电转 1 小时将凝胶上的蛋白转移到 0.22mm 的 PVDF 膜 (Bio-Rad) 上。用封闭缓冲液 (5% 脱脂奶粉的 PBS Tris 缓冲液 [TBS]) 在室温来处理转移的印记 1 小时并与一抗 (用稀释缓冲液 [含 5% 脱脂奶粉、0.1% Tween 20 的 TBS] 稀释) 在室温下孵育 1 小时或 4℃ 过夜。用洗涤缓冲液 (0.1% Tween 20 的 PBS) 洗涤 2 次后, 加入以 1 : 2000 稀释的第二抗体 (辣根过氧化物酶标记的抗人抗体 [IgG 特异, BDBiosciences 或 IgM 特异, Sigma] 或抗小鼠抗体 [Ig- 特异, BD Biosciences]) 并在室温下孵育 1 小时。在摇动平板上, 用洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次 15 分钟。在印迹上的免疫复合体可通过 ECL 组合试剂 (Amersham Biosciences) 产生化学发光并在 Hyperfilm-b max (Amersham Biosciences) 底片上暴光 30 秒到 3 分钟来观察。

##### [0260] 4b. 酶联免疫吸附检测 (ELISA)

[0261] 均用 ELISA 包被缓冲液 (pH 9.6) 稀释的天然病毒抗原 (1 : 200 贮存液稀释) 或重组病毒抗原 (5 μg/ml) 加到 96 孔微滴定平板 (Immunon 2, Dynatech) 上并 4℃ 孵育过夜。加入未知的用缓冲液 (1.3% 牛血清白蛋白, 0.25% 酪蛋白和 0.05% Tween 20 的 PBS) 做 1 : 50-1 : 200 稀释的人 (或小鼠) 血清来洗涤平板。室温下孵育 15 (或 60) 分钟后, 用洗涤缓冲液 (0.05% Tween 20 的 PBS) 洗涤 2 次后, 加入 100 μl 的检测抗体 (1 : 2000 稀释; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗人抗体 [IgG 或 IgM 特异] 或山羊抗小鼠 Ig [多价的]) 并在室温下孵育 15 分钟。洗涤 3 次后, 加入 100 μl 底物 (3,3',5,5'-四甲基联苯胺 [TMB]) 并在室温下孵育平板 15 分钟。加入 100ml 的 0.18M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 后, 15 分钟内用微滴定板记数仪 (Dynatech) 在 450nm 处检测 OD 值。

[0262] 实例 1 用 Western 印迹 (WB) 分析鉴定作为重要诊断抗原的核衣壳

[0263] 通过检测 SARS 患者对 SARS CoV 感染的抗体反应来鉴定患者的免疫反应是针对何种 SARS 病毒抗原。从含有病毒生长的培养细胞中提取一种病毒抗原的天然混合物并在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上分离。图 1A 所示为凝胶电泳后提取蛋白的凝胶蛋白谱。将该凝胶

上的蛋白转移至二氟聚偏乙烯膜上并与患者的血清孵育,然后通过直接抗患者抗体的酶联抗体检测结合到转移蛋白上的患者抗体,并用联结酶识别的荧光检测试剂来对其分析。该方法如以上段落(4a)所述。

[0264] 如图 1B 所示,SARS 患者反应最强烈但在非 SARS 患者中不存在的抗原位于 40kD 与 48kD 分子量之间,标记为“N1”、“N2”和“N3”。较低反应抗原位于 150kD(“S”)、80kD 和 60kD。反应性抗原 N1 的分子量与核衣壳蛋白相同。当通过 Western 印迹方法检测 46 个 SARS 患者、40 个非 SARS 肺炎患者和 38 个健康受试者时,SARS 患者的抗体反应直接首选在核衣壳上(78%阳性),在一个较少的范围内,为刺突蛋白(40%)(如图 2)。

[0265] 实例 2 用重组病毒抗原进行 ELISA 研究来检验核衣壳蛋白的重要性

[0266] 为检验该核衣壳是 SARS 致敏免疫系统所识别的主要 SARS 病毒抗原,在大肠埃希氏菌中生成 SARS 核衣壳重组抗原(N-末端一半和 C-末端一半)、刺突蛋白(3 个亚基)和非结构蛋白(NSP12[2 个亚基]、NSP9[1 个内在片段]、NSP13[全部])。图 3A 所示为这些病毒颗粒分子之间的关系。图 3B 所示为每个蛋白重组产生的区域。图 3C 为通过考马斯亮兰染色凝胶可粗略观察到每个重组表达蛋白的分子量。

[0267] 如上所述用患者血清对这些重组抗原进行 ELISA 分析。在此分析中,重组 N-末端核衣壳抗原(rNa)与作为天然病毒提取物的同一患者血清反应,表明 SARS 和非 SARS 个体之间有明显的区别(89%的敏感性,94%[非 SARS 肺炎]-98%[健康受试者]特异性)(见图 2)。图 4A 验证了用天然病毒提取物和用 rNa 进行 ELISA 分析之间的密切相关性。这些结果明显表明核衣壳是病毒提取物中的主要抗原。相反,用相同血清进行的 rNa ELISA 分析与主观鉴定 IF 分析之间没有明显的相关性(图 4A)。

[0268] 重组 C-末端核衣壳抗原(rNb)同样在 SARS 和非 SARS 患者之间有明显差异(见图 2),但与 rNa 还是有微小的区别并与天然抗原间的相关性略差,而与 IF 检测的相关性略好(图 4B)。

[0269] 一起使用两种重组核衣壳抗原(rNa+rNb),显示了非常好的 SARS 和非 SARS 患者差异(见图 2),并且结果近似于 IF 实验的结果(图 4C)。rNa 和 rNb 的不同相对比例可产生微小的差别并产生不同的敏感性和特异性。理想的组合中 rNb 的用量明显低于 rNa。实际上在检测中不使用 rNb 可到达最佳的特异性。因为在香港,与 SARS 患者有接触、但没有感染或患 SARS 病的人群占 0.38%,而且这些人群含有抗 rNb(更特异地,就在 C-末端)的抗体而没有抗 rNa 的抗体。此种反应性的原因还不清楚,但引起了 SARS 生物学界的极大兴趣。因 SARS 患者可产生抗 rNa 和 rNb 的抗体,因此,含抗 rNa 和 Nb 的检测将比单独抗 rNa 更敏感,并将是优选的 SARS 筛查实验方法。可单独使用 rNa 和 rNb 的实验及其它类型的实验来肯定组合实验的阳性样品,并结合临床症状来判断。

[0270] rNa 与 rNb 抗原可以相似地用于检测诸如麝猫的动物和其它野生动物中的抗 SARS 病毒或相关病毒的抗体,以观察这些动物是否携带该病毒时。此处使用的分析方法与用于人的方法类似,除非产生的抗体不同,该抗体是否有种属特异性还不清楚。

[0271] 此外,从丙稀酰胺凝胶提取的 N2 和 N3 抗原可用于 ELISA 分析(如图 1A),当筛选患者样品时,该分析与 rNa ELISA 的分析结果极为相似(见图 2),表明 N2 和 N3 与核衣壳有共用的氨基酸序列。

[0272] 当使用重组刺突蛋白抗原进行 ELISA 分析时,rSa 和 rSb 不与患者血清反应,而

rSc 有部分 (13%) 的 SARS 血清反应但与非 SARS 血清的反应比例相似 (图 2), 提示该刺突蛋白不是 SARS CoV 的免疫化学为基础的诊断分析的好的抗原来源。但是, 真核系统来源的 rSA 抗原的免疫反应有所改进, 表明了多糖在抗原性中的重要性 (资料未显示)。同样, 重组非结构蛋白 NSP12 (a 和 b) 和 NSP9 与 SARS 血清也不反应, 而 NSP13 (一种甲基转移酶) 在部分病例中与 SARS 血清有反应, 但也与对照血清有交叉反应 (资料未显示)。

[0273] 实例 3 用 SEQ ID NO :2 的重组蛋白进行竞争性分析

[0274] 为确定从图 1 所示的天然病毒提取物中鉴定的 N1 抗原是所述的核衣壳蛋白, 将重组蛋白 rNa (SEQ ID NO :2) 作为 Western 印迹分析的抑制剂使用。如图 5A 所示, 使用 2 个患者的血清 (S35 和 S44) 且每份血清混合有的 rNa, rNa 不但能明显阻断抗体与 N1 的相互作用, 而且还能阻断与 N2 和 N3 抗原的作用。第四种抗原 N4 也被抑制。抑制程度最大的为 N3 和 N4, 其次为 N2, 然后为 N1。相反, 当刺突抗原 rSb 与该血清混合时, N1-N4 的活性不受影响, 而在 150kd 区域 (“S”) 的反应却完全被抑制 (图 5A)。这表明 N1-N4 是全部的核衣壳抗原, 而且 N2、N3 和 N4 是 N1 的片段, 其中 C- 末端延伸的长度从 N2 至 N4 逐渐缺失。图 5A 为 2 个 SARS 患者血清 (#35 和 #44) 抗天然病毒提取物的病毒抗原 (作为抑制剂使用) 的 Western 印迹分析。抗原如图 2 和 3 所定义; rNSP 为 rNSP12b。其它注释如图 1 所示。

[0275] 图 5B 为小鼠血清抗天然病毒提取物的 Western 印迹分析。血清 1、2 和 3 分别来自 3 只用 rNa 免疫 (初始剂量 +1 次强化) 的 BALB/c 小鼠。U 为非免疫小鼠 (3 只小鼠为代表) 的血清; S 为用 rSa 或 rSb 抗原 (每组 3 只小鼠为代表) 免疫 (与 rNa 方案相同, 使用相同剂量的抗原) 的小鼠血清。结果证实 N1-N4 为核衣壳抗原。

[0276] 实施例 4 用重组蛋白 SEQ ID NO :2 对小鼠的免疫

[0277] 使用均连接到一个载体蛋白 (谷胱甘肽 -S- 转移酶或 GST, 此处作为标签而非佐剂使用) 的重组抗原 rNa、rSa 和 rSb 来免疫动物, 而且这些与天然病毒提取物反应的动物血清用来作 Western 印迹分析。每只小鼠腹腔注射 0.2mg 溶于完全 Freund 佐剂的抗原, 2 周后, 同样腹腔给予溶于不完全 Freund 佐剂的一次强化剂量 (四分之一的初始剂量或 0.05mg)。图 5B 所示为所有用 rNa 免疫的 3 只小鼠所产生的抗体与 N1、N2、N3 和 N4 而非其它抗原的特异反应。图 5C 所示为所有 3 只小鼠中 rNa 重组蛋白所产生的抗体为非常高的水平, 而载体蛋白 (GST) 所产生的抗体却很少。这表明核衣壳蛋白非常活跃。相反, 与 rNa 相同剂量和方式的重组刺突蛋白 (rSa 或 rSc) 在任意动物 (3 只动物的每只) 中均不产生任何反应性抗体。此外, 图 5C 所示为这些动物也产生非常少的抗 rSa 或 rSc 本身的抗体同时也产生几乎直接抗载体蛋白的抗体。这表明, 刺突蛋白没有活性。事实上, 该核衣壳抗原 (rNa) 能以 1/10 甚至 1/100 的 (每只动物 0.02mg, 初始剂量) 刺突抗原 (rSa or rSc) 的浓度同样能在动物中产生高水平的抗核衣壳抗体 (资料未显示)。这表明, 用刺突蛋白作为佐剂, 将刺突蛋白合并到核衣壳蛋白上形成一个疫苗是可能的。这种多抗原疫苗优选在真核系统中表达而不是细菌中, 这样刺突蛋白可以进行适当的糖基化。

[0278] <110> 香港中文大学

[0279] <120> 诊断与预防严重急性呼吸道综合症 (SARS) 的组合物和方法

[0280] <130>04F651-WDZ

[0281] <150>NO. 60/507, 207

[0282] <151>2003-09-29



[0322]	Glu Gly Ile Val Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys	
[0323]	130	135 140
[0324]	Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asn Ala Ala Thr Val Leu	
[0325]	145	150 155 160
[0326]	Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly	
[0327]	165	170 175
[0328]	Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg	
[0329]	180	185 190
[0330]	Gly Asn Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Asn Ser Pro	
[0331]	195	200 205
[0332]	Ala Arg Met Ala Ser Gly Gly Gly Glu Thr Ala Leu	
[0333]	210	215 220
[0334]	<210>3	
[0335]	<211>30	
[0336]	<212>DNA	
[0337]	<213>rNa 的 5' 引物	
[0338]	<400>3	
[0339]	cgtgatcca tgtctgataa tggaccccaa	30
[0340]	<210>4	
[0341]	<211>32	
[0342]	<212>DNA	
[0343]	<213>rNa 的 3' 引物	
[0344]	<400>4	
[0345]	cgatgaattc cgaggcagc ttcaccacct cc	32
[0346]	<210>5	
[0347]	<211>627	
[0348]	<212>DNA	
[0349]	<213>C- 末端核衣壳核苷酸序列 (rNb)	
[0350]	<400>5	
[0351]	ggaggtggtg aaactgccct cgcgctattg ctgctagaca gattgaacca gcttgagagc	60
[0352]	aaagtttctg gtaaaggcca acaacaaca ggccaaactg tactaagaa atctgctgct	120
[0353]	gaggcatcta aaaagcctcg ccaaaaacgt actgccaca aacagtacaa cgtcactcaa	180
[0354]	gcatttggga gacgtggtcc agaacaacc caaggaaatt tcggggacca agacctaatc	240
[0355]	agacaaggaa ctgattacaa acattggccg caaattgcac aatttgcctc aagtgcctct	300
[0356]	gcattctttg gaatgtcag cattggcatg gaagtcaac cttcgggaac atggctgact	360
[0357]	tatcatggag ccattaaatt ggatgacaaa gatccacaat tcaaagacaa cgtcatactg	420
[0358]	ctgaacaagc acattgacgc atacaaaaca ttcccacaa cagagcctaa aaaggacaaa	480
[0359]	aagaaaaaga ctgatgaagc tcagcctttg ccgcagagac aaaagaagca gccactgtg	540
[0360]	actcttcttc ctgcggtgga catggatgat ttctccagac aacttcaaaa ttccatgagt	600





[0439]	Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly Phe Leu Tyr Val Tyr Lys		
[0440]	65	70	75 80
[0441]	Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly Phe Asn		
[0442]		85	90 95
[0443]	Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu Gly Ile Asn Ile Thr Asn		
[0444]		100	105 110
[0445]	Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro Ala Gln Asp Ile Trp Gly		
[0446]		115	120 125
[0447]	Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr Leu Lys Pro Thr Thr Phe		
[0448]		130	135 140
[0449]	Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys		
[0450]	145	150	155 160
[0451]	Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys Ser Val Lys Ser Phe Glu		
[0452]		165	170 175
[0453]	Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Val Pro Ser		
[0454]		180	185 190
[0455]	Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly		
[0456]		195	200 205
[0457]	Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg		
[0458]		210	215 220
[0459]	Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser		
[0460]	225	230	235 240
[0461]	Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu		
[0462]		245	250 255
[0463]	Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Val Lys		
[0464]		260	265 270
[0465]	Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala		
[0466]		275	280 285
[0467]	Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Met Gly Cys Val Leu Ala		
[0468]		290	295 300
[0469]	Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser Thr Gly Asn Tyr Asn		
[0470]	305	310	315
[0471]	<210>11		
[0472]	<211>30		
[0473]	<212>DNA		
[0474]	<213>rSa 的 5' 引物		
[0475]	<400>11		
[0476]	cgtggatcca atttactaa tgttgttata	30	
[0477]	<210>12		

[0478]	<211>32	
[0479]	<212>DNA	
[0480]	<213>rSa 的 3' 引物	
[0481]	<400>12	
[0482]	cgatgaattc cattataatt accagttgaa gt	32
[0483]	<210>13	
[0484]	<211>1365	
[0485]	<212>DNA	
[0486]	<213> 中间刺突核苷酸序列 (rSb)	
[0487]	<400>13	
[0488]	acttcaactg gtaattataa ttataaatat aggtatctta gacatggcaa gcttaggcc	60
[0489]	tttgagagag acatatctaa tgtgcctttc tcccctgatg gcaaaccttg caccccacct	120
[0490]	gctcttaatt gttattggcc attaaatgat tatggttttt acaccactac tggcattggc	180
[0491]	taccaacctt acagagttgt agtactttct tttgaacttt taaatgcacc ggccacggtt	240
[0492]	tgtggaccaa aattatccac tgaccttatt aagaaccagt gtgtcaattt taattttaat	300
[0493]	ggactcactg gtactgggtg gttactcct tcttcaaaga gattcaacc atttcaacaa	360
[0494]	tttggccgtg atgtttctga tttcactgat tccgttcgag atcctaaaac atctgaaata	420
[0495]	ttagacattt caccttgctc ttttgggggt gtaagtgtaa ttacacctgg aacaaatgct	480
[0496]	tcacttgaag ttgetgttct atatcaagat gttactgca ctgatgttct tacagcaatt	540
[0497]	catgcagatc aactcacacc agcttggcgc atatattcta ctggaacaaa tgtattccag	600
[0498]	actcaagcag getgtcttat aggagctgag catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt	660
[0499]	cctattggag ctggcatttg tgctagttac catacagttt ctttattacg tagtactagc	720
[0500]	caaaaatcta ttgtggctta tactatgtct ttaggtgctg atagttcaat tgcttactct	780
[0501]	aataacacca ttgctatacc tactaacttt tcaattagea ttactacaga agtaatgcct	840
[0502]	gtttctatgg ctaaaacctc cgtagattgt aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa	900
[0503]	tgtgctaatt tgcttctcca atatggtagc ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca	960
[0504]	ggtattgctg ctgaacagga tcgcaacaca cgtgaagtgt tegctcaagt caaacaatg	1020
[0505]	tacaaaacce caactttgaa atattttggg ggttttaatt tttcaciaat attacctgac	1080
[0506]	cctctaaage caactaagag gtcttttatt gaggacttgc tctttaataa ggtgacactc	1140
[0507]	gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat	1200
[0508]	ctcatttgtg cgcagaagtt caatggactt acagtggtgc cacctctgct caetgatgat	1260
[0509]	atgattgctg cctacactgc tgctctagtt agtggactcg ccaactgctgg atggacattt	1320
[0510]	ggtgctggcg ctgctcttca aatacctttt gctatgcaaa tggca	1365
[0511]	<210>14	
[0512]	<211>455	
[0513]	<212>PRT	
[0514]	<213> 中间刺突氨基酸序列 (rSb)	
[0515]	<400>14	
[0516]	Thr Ser Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly	

[0517]	1	5	10	15
[0518]	Lys Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser AsnVal Pro Phe Ser Pro			
[0519]		20	25	30
[0520]	Asp Gly Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu			
[0521]		35	40	45
[0522]	Asn Asp Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr			
[0523]		50	55	60
[0524]	Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val			
[0525]		65	70	75
[0526]	Cys Gly Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn			
[0527]		85	90	95
[0528]	Phe Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser			
[0529]		100	105	110
[0530]	Lys Arg Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe			
[0531]		115	120	125
[0532]	Thr Asp Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser			
[0533]		130	135	140
[0534]	Pro Cys Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala			
[0535]		145	150	155
[0536]	Ser Ser Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val			
[0537]		165	170	175
[0538]	Ser Thr Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr			
[0539]		180	185	190
[0540]	Ser Thr Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly			
[0541]		195	200	205
[0542]	Ala Glu His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala			
[0543]		210	215	220
[0544]	Gly Ile Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser			
[0545]		225	230	235
[0546]	Gln Lys Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser			
[0547]		245	250	255
[0548]	Ile Ala Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile			
[0549]		260	265	270
[0550]	Ser Ile Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val			
[0551]		275	280	285
[0552]	Asp Cys Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu			
[0553]		290	295	300
[0554]	Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser			
[0555]		305	310	315
				320

[0556]	Gly Ile Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln	
[0557]	325 330 335	
[0558]	Val Lys Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe	
[0559]	340 345 350	
[0560]	Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser	
[0561]	355 360 365	
[0562]	Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly	
[0563]	370 375 380	
[0564]	Phe Met Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp	
[0565]	385 390 395 400	
[0566]	Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu	
[0567]	405 410 415	
[0568]	Leu Thr Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly	
[0569]	420 425 430	
[0570]	Thr Ala Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile	
[0571]	435 440 445	
[0572]	Pro Phe Ala Met Gln Met Ala	
[0573]	450 455	
[0574]	<210>15	
[0575]	<211>30	
[0576]	<212>DNA	
[0577]	<213>rSb 的 5' 引物	
[0578]	<400>15	
[0579]	cgtgatcca cttcaactgg taattataat	30
[0580]	<210>16	
[0581]	<211>32	
[0582]	<212>DNA	
[0583]	<213>rSb 的 3' 引物	
[0584]	<400>16	
[0585]	cgatgaattc ctgccatttg catagcaaaa gg	32
[0586]	<210>17	
[0587]	<211>948	
[0588]	<212>DNA	
[0589]	<213>C- 末端刺突核苷序列 (rSc)	
[0590]	<400>17	
[0591]	ccttttgcta tgcaaatggc atataggttc aatggcattg gagttacca aaatgttctc	60
[0592]	tatgagaacc aaaaacaaat cgccaaccaa tttaacaagg cgattagtca aattcaagaa	120
[0593]	tcacttaca caacatcaac tgcattgggc aagctgcaag acgttggttaa ccagaatgct	180
[0594]	caagcattaa acacacttgt taacaactt agctctaatt ttggtgcaat ttcaagtgtg	240



[0634]	Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys Ala Tyr	
[0635]	180	185 190
[0636]	Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser Trp Phe Ile	
[0637]	195	200 205
[0638]	Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr	
[0639]	210	215 220
[0640]	Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Ile Asn Asn Thr	
[0641]	225	230 235 240
[0642]	Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu	
[0643]	245	250 255
[0644]	Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp	
[0645]	260	265 270
[0646]	Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp	
[0647]	275	280 285
[0648]	Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu	
[0649]	290	295 300
[0650]	Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp	
[0651]	305	310 315
[0652]	<210>19	
[0653]	<211>30	
[0654]	<212>DNA	
[0655]	<213>rSc 的 5' 引物	
[0656]	<400>19	
[0657]	cgtggatccc cttttgctat gcaaatggca	30
[0658]	<210>20	
[0659]	<211>32	
[0660]	<212>DNA	
[0661]	<213>rSc 的 3' 引物	
[0662]	<400>20	
[0663]	cgatgaattc cccatttaac atattgctca ta	32

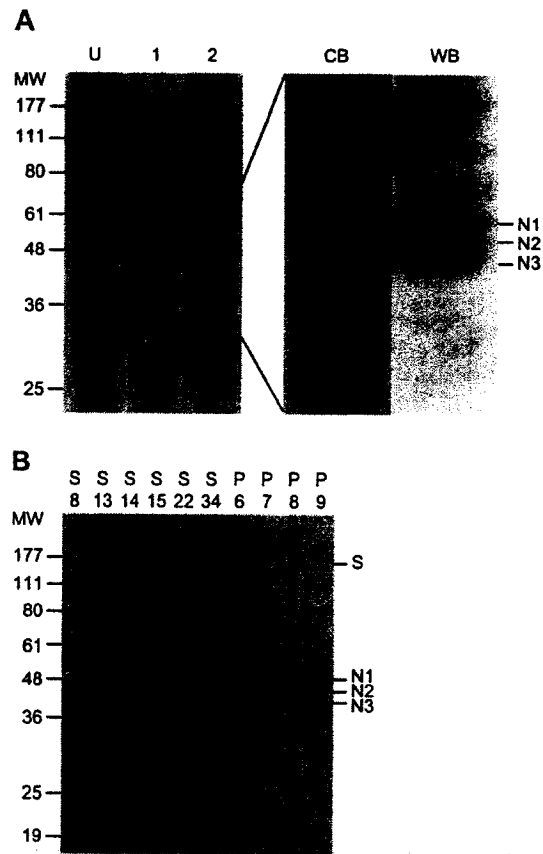


图 1

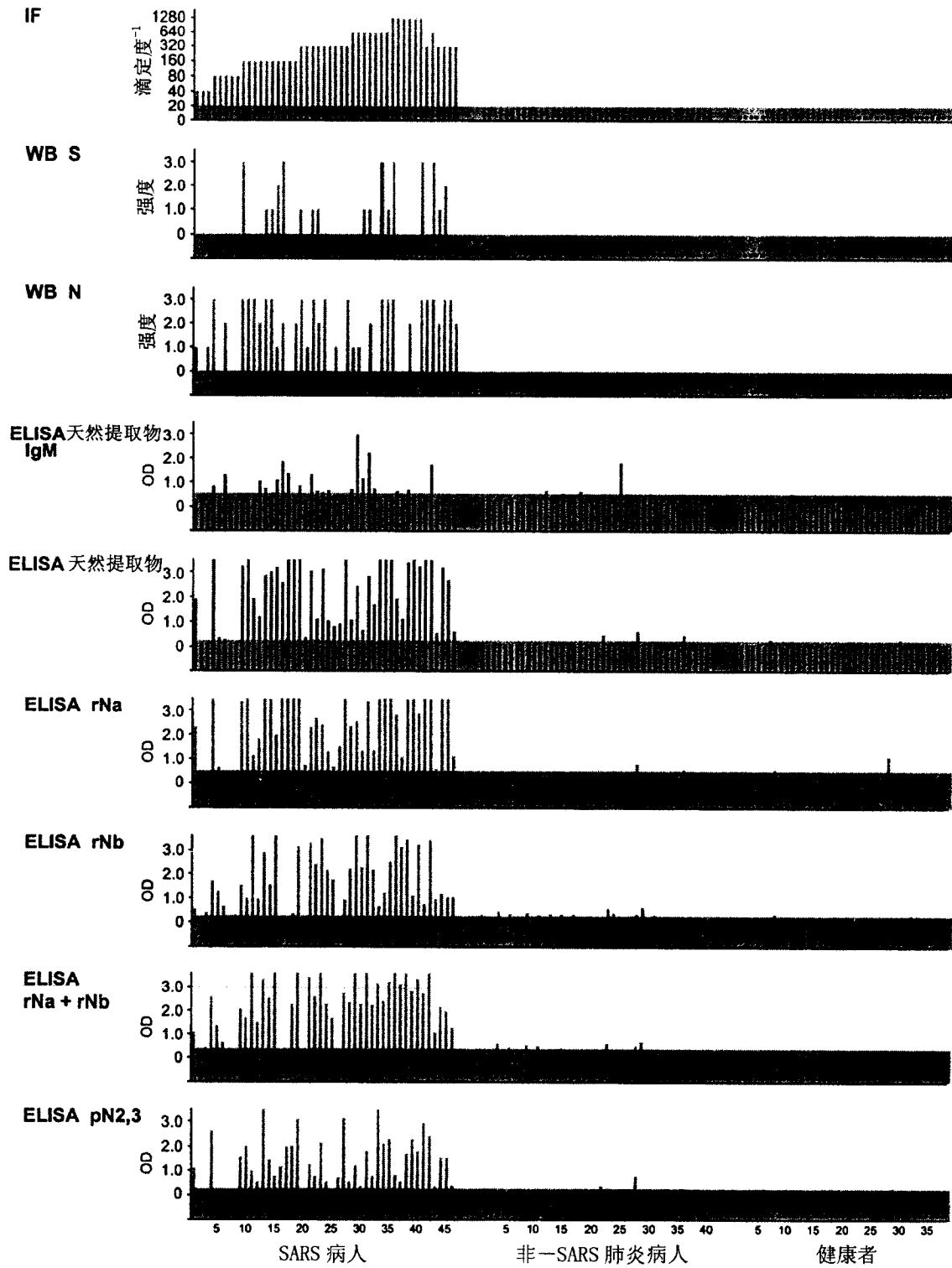
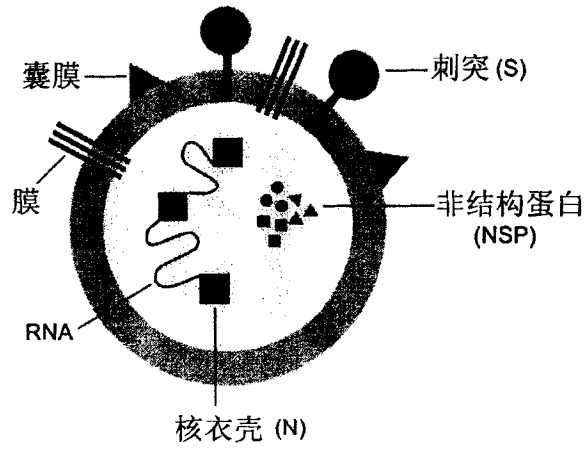


图 2

A



B

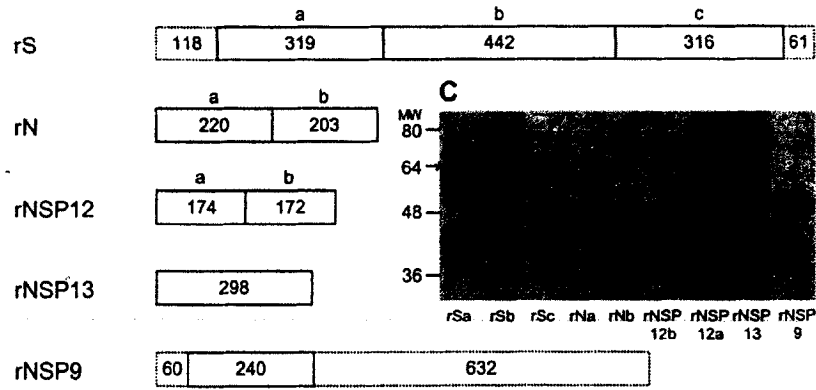


图 3

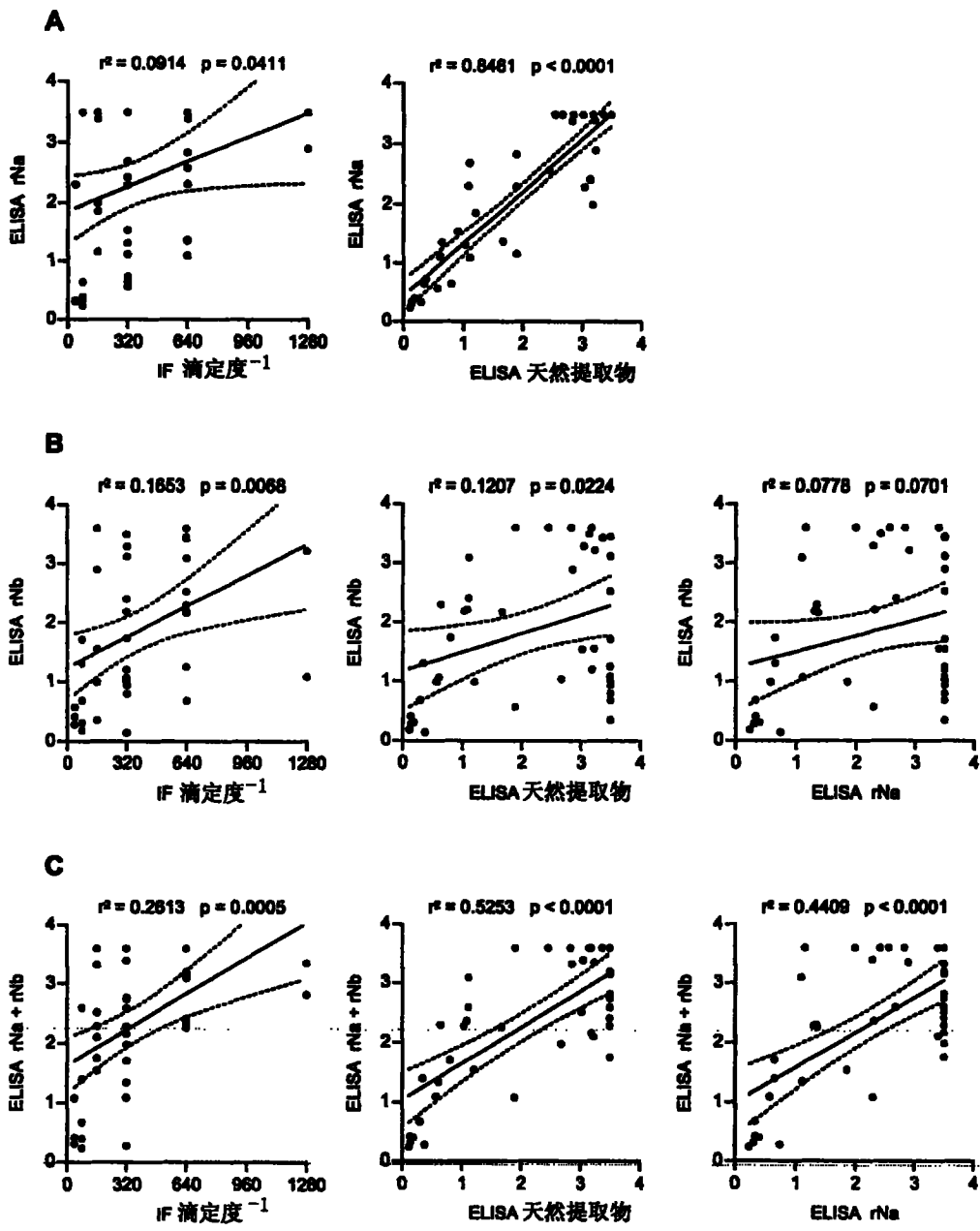


图 4

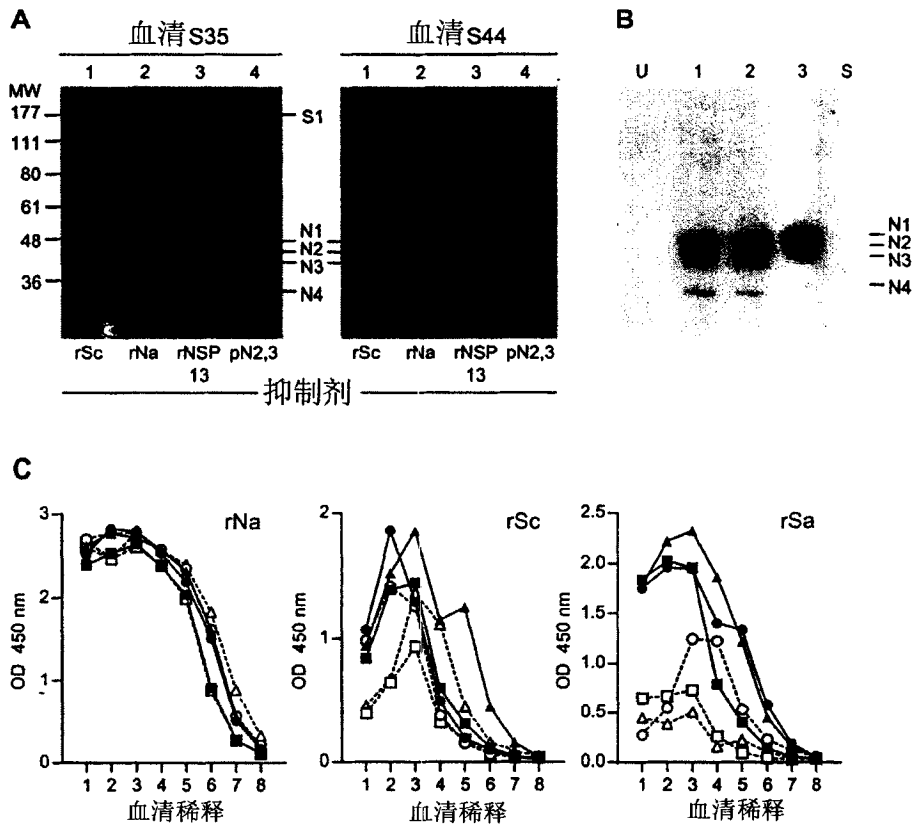


图 5

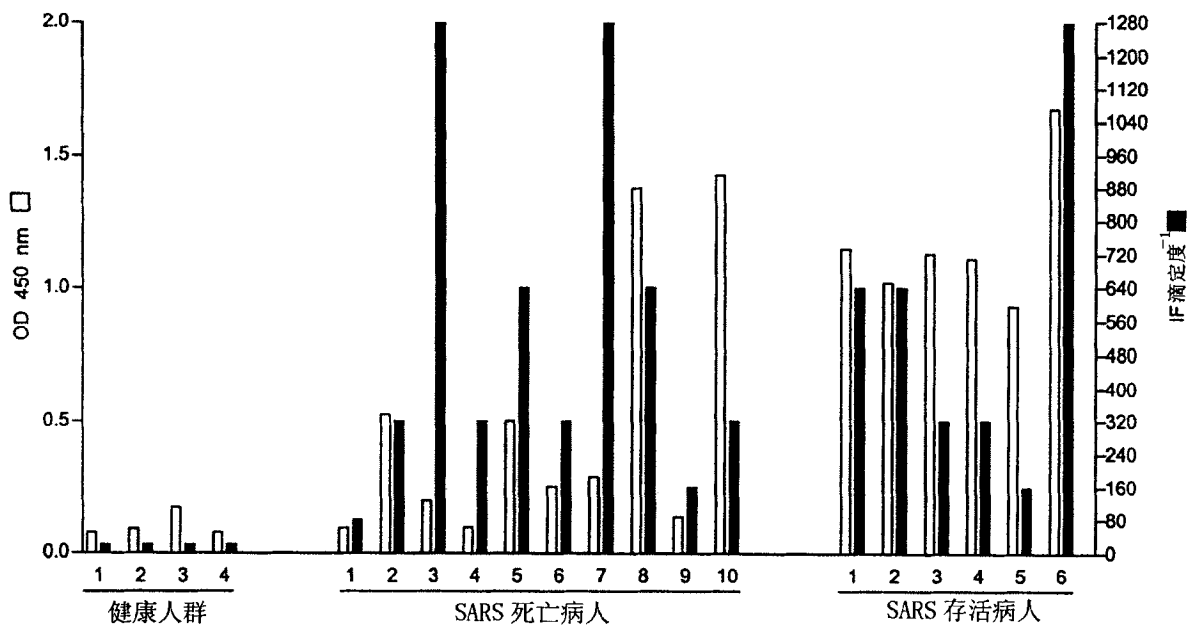


图 6

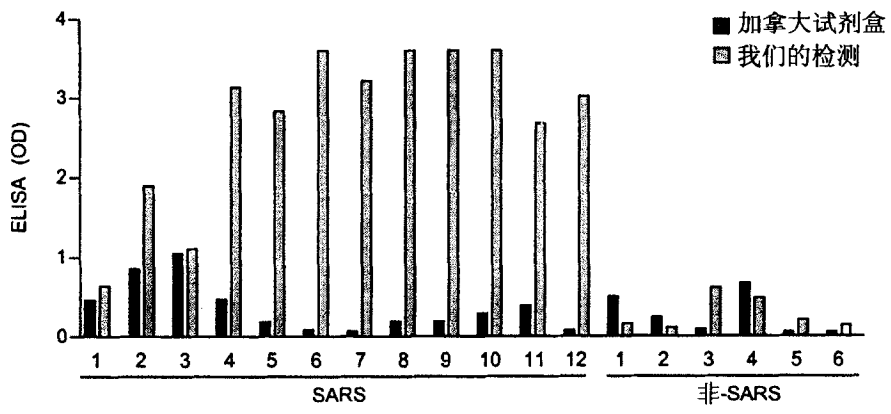


图 7

